ISOENZYME DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE (ORTHOPHOSPHORSÄUREMONOESTER PHOSPHOHYDROLASE EC 3.1.3.1) AUS MENSCHLICHEN UND TIERISCHEN ORGANEN

Isolierung, biochemische und immunologische Charakterisierung

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von
Mohammed Joma Khattab

Bochum 1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546609_0033

ISOENZYME DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE (ORTHOPHOSPHORSÄUREMONOESTER PHOSPHOHYDROLASE EC 3.1.3.1) AUS MENSCHLICHEN UND TIERISCHEN ORGANEN

Isolierung, biochemische und immunologische Charakterisierung

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Mohammed Joma Khattab

Bochum 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 7. 1976

Dekan : Prof. Dr. G. Snatzke

Referent : Prof. Dr. G. Pfleiderer

Koreferent : Prof. Dr. L. Heilmeyer

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Gerhard Pfleiderer,

spreche ich für die Überlassung des Themas

und für seine Hilfe und seine zahlreichen

wertvollen Anregungen und Hinweise bei der

Durchführung dieser Arbeit sowie für die

gewährte finanzielle Unterstützung

meinen herzlichen Dank aus.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 7. 1976

Dekan : Prof. Dr. G. Snatzke

Referent : Prof. Dr. G. Pfleiderer

Koreferent : Prof. Dr. L. Heilmeyer

Meinem hochverehrten Lehrer,

Herrn Professor Dr. Gerhard Pfleiderer,

spreche ich für die Überlassung des Themas

und für seine Hilfe und seine zahlreichen

wertvollen Anregungen und Hinweise bei der

Durchführung dieser Arbeit sowie für die

gewährte finanzielle Unterstützung

meinen herzlichen Dank aus.

INHALTSVERZEICHNIS

I. THEORETISCHER TEIL

1. Allgemeine Übersicht über die alkalische Phosphatase 1

2. Die molekulare Basis der Isoenzym-Systeme 12

3. Enzyme und Diagnostik 18

II. PROBLEMSTELLUNG 23

III. ERGEBNISSE

Teil I : Isolierung, Reinigung und biochemische Charakterisierung der alkalischen Phosphatasen aus menschlichen und tierischen Organen 24

A. Alkalische Phosphatase aus menschlichen Organen 26

A.1. Dünndarm-alkalische Phosphatase 26

A.2. Leber-- alkalische Phosphatase 31

A.3. Placenta-alkalische Phosphatase 38

A.4. Nieren-alkalische Phosphatase 46

A.5. Knochen-alkalische Phosphatase 53

B. Isolierung der alkalischen Phosphatase aus tierischen Organen 56

B.1. Kälber-Dünndarm alkalische Phosphatase 56

B.2. Alkalische Phosphatase aus anderen Kälber-Organen 61

C. Untersuchung anderer präparativer Methoden zur Reinigung der alkalischen Phosphatase 63

1. Hydroxylapatit 63

2. Cellulose-Phosphat 65

3. Affinitätschromatographie und hydrophobe Chromatographie 65

4. Präparative Polyacrylamidgel-Elektrophorese 68

5. Präparative Isotachophorese in Polyacrylamid-Gelen 70

D. Molekulargewichtsbestimmung 73

1. Gelfiltration 73

2. Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese 74

3. Dodecylsulfat-Gel-Elektrophorese 75

E. Elektrophoretische Eigenschaften der alkalischen Phosphatase 77

1. Stärke-Gel-Elektrophorese 77

2. Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese 80

3. Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid-Gele 82

F. Biochemische Eigenschaften der alkalischen Phosphatase 90

1. Hitze-Stabilität 90

2. L-Phe - Effekt 91

3. Die Wirkung von Harnstoff 92

4. Effekt von EDTA und Metal-Ionen 93

5. Kinetische Eigenschaften 95

G. D i s k u s s i o n 97

Teil II : Immunoenzymologische Ergebnisse 108

A. Gewinnung und allgemeine Eigenschaften des Kaninchen-Anti-alkalische Phosphatase-Serums ... 109

B. Eigenschaften der Antigen(ALP)-Antikörper (Anti-ALP-Serum) Reaktion 112

C.1. Immunochemische Eigenschaften der alkalischen Phosphatase aus menschlichem Dünndarm 114

C.2. Immunochemische Eigenschaften des Anti-Placenta-ALP-Serums 118

C.3. Anti-Nieren-ALP-Serum 124
C.4. Immunochemische Eigenschaften des Anti-Leber-ALP-Serums 129
C.5. Immunochemische Eigenschaften des Antiserums gegen Kälber- und Schweine-Dünndarm-ALP 132
D. Immunoabsorptions-Versuche 135
E. Quantitative Bestimmung der alkalischen Phosphatasen in künstlichen Gemischen 137
F. D i s k u s s i o n 138

Teil III : Untersuchungen über die alkalische Phosphatase in Faeces, Gallenflüssigkeit, Urin und Blutserum des Menschen 143
1. Alkalische Phosphatase aus menschlicher Faeces . 144
1.1. Isolierung und Reinigung der Faeces-ALP 144
1.2. Immunochemische Eigenschaften der Faeces-ALP .. 149
1.3. Untersuchung der ALP in den Faeces von Menschen mit Krankheiten des Verdauungstraktes 150
2. Alkalische Phosphatase der Gallenflüssigkeit ... 153
2.1. Reinigung der Gallen-ALP 153
2.2. Elektrophoretische Eigenschaften 154
2.3. Immunochemische Eigenschaften 154
3. Urin-alkalische Phosphatase 155
3.1. Anreicherung der ALP im normalen Harn 155
3.2. Elektrophoretische Eigenschaften 156
3.3. Immunochemische Eigenschaften 156
4. Serum-alkalische Phosphatase 157
5. D i s k u s s i o n 160
IV. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE 167

V. METHODEN UND MATERIAL 172
1. Allgemeine Methoden 172
2. Analytische Methoden 172
2.1. Proteinbestimmung 172
2.2. Enzymtest 173
3. Elektrophoretische Methoden 174
4. Anfärbe Methoden 177
5. Molekulargewichtsbestimmung-Methoden 177
6. Immunologische Methoden 178
7. Konzentrierung von Protein-Lösungen 182
8. Chemikalien 182
9. Geräte 183
VI. LITERATURVERZEICHNIS 184
Abkürzungen..... 192

THEORETISCHER TEIL

1. Allgemeine Übersicht über die alkalische Phosphatase:

Im Jahre 1907 entdeckte Suzuki[1] die Existenz einer alkalischen Phosphatase. Er stellte fest, daß aus Phytin (Ca-Mg Salz des Inosithexaphosphats) anorgan. Phosphat, durch ein Enzym abgespalte wird, das in Reis- und Weizenspelzen vorkommt. Gleichzeitig vermutete er, daß dieses Enzym in der Natur weit verbreitet ist.
Weitere Arbeiten von McCollum und Hart 1908[2], von Euler und Funke 1912[3], Grosser und Husler 1912[4] bestätigten, daß in Gegenwart verschiedener pflanzlicher und tierischer Extrakte aus einer Vielzahl von Phosphorsäureestern Orthophosphat freigesetzt wird. Aber erst die Publikation von Robison 1923 [5] über die Knochen-Phosphatase erweckte allgemeines Interesse an diesem Enzym. Robison entdeckte nicht nur in der Knochensubstanz wachsender Tiere hohe Aktivität eines Enzyms, das die Hydrolyse von Hexose-mono phosphat katalysiert, sondern stellte auch fest, daß das pH-Optimum dieses Enzyms im alkalischen Bereich lag. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellte er Hypothesen über die Rolle dieser Phosphatase bei der Knochenbildung auf [6].
Während der folgenden Dekade schien Robison das Feld der Phosphataseforschung zu beherrschen und beschäftigte sich hauptsächlich mit der Knochenbildung und der Rolle, die die Knochenphosphatase dabei spielt. Es wurden auch andere wichtige Entdeckungen über die Phosphatase gemacht; so wurde erhöhte alkalische Phoshphatase-Aktivität im Serum bei verschiedenen klinischen Fällen beschrieben und verbesserte Methoden für den alkalischen Phosphatase-Test entwickelt [7-9], die mit kleinen Abwandlungen heute noch angewandt werden. In dieser Zeit wurde auch die Frage der Gewebe-Spezifität erhoben. Kay 1932 [10] vermutete, daß die Phosphatasen aus Knochen, Darm, Niere und Plasma identisch sind, da sie viele Eigenschaften gemeinsam haben. Bodansky 1934 [11] stellte fest, daß die Darm-Phosphatase aus verschiedenen Spezies durch Gallensäuren nicht gehemmt wird, während die aus Knochen und Nieren isolierten Enzyme inaktiviert wurden. Von diesem Zeitpunkt an wurden große Anstrengungen unternommen, um alkalische Phosphatasen aus Bakterien sowie tierischen und menschlichen Geweben zu reinigen und möglicherweise zu kristallisieren. Dabei wurde über große Unterschiede in den Eigenschaften der Enzyme aus verschiedenen Geweben verschiedener Arten berichtet.
Klassifizierung: Alkalische Phosphatase oder Mono-Phosphohydrolase gehört zu einer Gruppe von Enzymen, die die Abspaltung von Orthophosphat aus Phosphorsäureestern katalysieren. Hinzu rechnet man auch eine große Zahl von Enzymen, die zum Teil wichtige Funktionen bei der Verdauung oder im intermediären Stoffwechsel erfüllen. Man unter-

teilt sie aufgrund einer Reihe von Parametern wie pH-Optimum, Substrat-Spezifität und Art der zu hydrolysierende Phosphatester, in folgende Klassen, die dann weiter unterteilt werden können.

I) Gruppenspezifische Enzyme:

1) Monoesterasen, die unabhängig von Rest R alle Phosphorsäureester spalten.

2) Phosphodiesterasen, die Orthophosphorsäurediester an einer ihrer Esterbindungen spalten.

3) Pyrophosphatasen, die die Pyrophosphatbindung von Pyrophosphorsäure oder ihren Estern spalten.

4) Metaphosphatasen, die Metaphosphate hydrolysieren.

II) Substratspezifische Phosphatasen:

Diese katalysieren die Hydrolyse nur eines ganz bestimmten Substrates, nach dem sie dann benannt werden, z.B. ATP-ase. Die Phosphomonoesterasen können weiter unterteilt werden in spezifische, die nur ein bestimmtes Substrat umsetzen, und unspezifische, die eine große Zahl verschiedener Substrate umsetzen.
Aufgrund des pH-Optimums können die Monoesteasen weiter unterteilt werden in saure und alkalische Phosphatase.
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der alkalischen Phosphatase, deren systematischer Name nach einem Vorschlag der internationalen Enzymkommission (1961) lautet:
"Orthophosphorsäure-monoester-Phosphohydrolase"
EC. 3.1.3.1.

Vorkommen und physiologische Bedeutung:

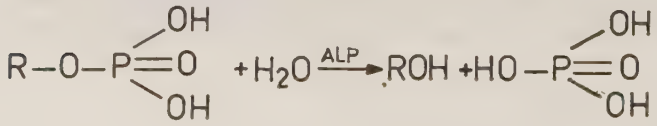
ALP ist in der Natur weit verbreitet. Man hat sie sowohl in Geweben von Säugern als auch in Fischen, Bakterien und Pilzen gefunden. Die relativen Aktivitäten in den verschiedenen Geweben sind gut untersucht und stufen sich folgendermaßen ab: Placenta~Darm>Niere~Knochen~Leber>Milz Pankreas>Gehirn~Lunge.

Die Kontroverse, die es zur Zeit zur Lokalisation der ALP gibt, scheint auf Unterschieden im methodischen Vorgehen zu beruhen und auf Schwierigkeiten, histologische Befunde mit Ergebnissen aus der Ultrazentrifugationsanalyse zu vergleichen. Jedoch zeigen die meisten Untersuchungen über subzelluläre Fraktionierung verschiedener Zellarten und verschiedener Organe, daß der Großteil der Enzymaktivität in der "mikrosomalen" Fraktion lokalisiert ist [12].
Histochemische Untersuchungen weisen darauf hin, daß das Enzym im Darm hauptsächlich an der Oberflächenmembran der epithelialen Zellmikrovilli vorkommt [13-15]. In gleicher Weise ist die Nieren-ALP bevorzugt in den Mikrovilli der proximalen tubulären Zellen [16] lokalisiert, und zwar in der gesamten Oberflächenmembran der Zellen einschließlich der basalen Einfaltungen und der den interzellulären Räumen angrenzenden Membranen [17].
In der menschlichen Placenta fand man das Enzym an der Plasmamembran, die die Mikrovilli umgibt, in Vesikeln der Synzytiotrophoblasten und an der basalen Oberfläche der Synzytiotrophoblasten [18]. Histochemische Untersuchungen an der Leber zeigen, daß sich das Enzym in den Zellplasmamembranen befindet, und insbesondere in solchen Membranen, die die Gallen-Canaliculi umgeben [19]. In Knochen findet man es in hypertrophen Knorpelzellen, Osteoblasten und Osteozyten [20].
Bei E. Coli ist die Phosphatase im Periplasma lokalisiert und anscheinend nicht an die Zellwand oder die Zellmembran gebunden [21].
Die Annahme, daß diese Gruppe von Enzymen auf irgendeine Weise mit dem aktiven Transport in Verbindung steht, beruht auf ihrer Lokalisation innerhalb der Zellen, ihrer Fähigkeit anorganisches Phosphat zu binden [22] und auf Versuchsergebnissen, die man mit Bakterien-ALP gewonnen hat [23]. Fishman und Lin [24] deuteten an, daß ALP bei der Regulation der Dimensionen der Membran mit anderen Membranphosphohydrolasen und - Transferasen zusammenwirken kann. Aufgabe der ALP kann aber auch sein, die Versorgung der Zelle mit anorganischem Phosphat für metabolische, exkretorische und einige sekretorische Zwecke sicherzustellen. Die beträchtlichen Konzentrationen an unspezifischer ALP in der laktierenden Brustdüse und in den Nieren unterstützen diese Annahme.
Die mögliche biologische Bedeutung der ALP als Katalysator für die Bildung von Phosphat wird außerdem durch die Tatsache unterstrichen, daß die höchsten ALP-Konzentrationen in der Dünndarm-Mucosa von jungen Tieren angetroffen werden [25].
Es ist darauf hingewiesen worden, daß die ALP an der Calciumresorption aus dem Dünndarm beteiligt sein kann und es sich um dasselbe Enzym handelt wie die Calcium-aktivierte Adenosintriphosphatase [26] Moog [27] untersuchte die Änderung des ALP-Spiegels im Laufe der Entwicklung von Hühnchen und jungen Mäusen und zeigte, daß der ALP-Spiegel zu dem Zeitpunkt zunimmt, zu dem auch die Resorptionsleistung ansteigt. Bei jungen Mäusen nahm die Enzymaktivität

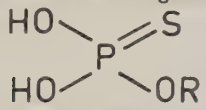
während der Entwicklung zu, wenn Cortison-Acetat oder Adrenocorticotrophes Hormon gegeben wurde. Das scheint auf eine 'Pituitary'-Adrenal-Kontrolle des Phosphataspiegels bei jungen Mäusen hinzuweisen. Moog beobachtete, daß der Phosphat-Transport im Zwölffingerdarm von Mäusen durch L-Phe und Beryllium gehemmt wurde und äußerte die Vermutung, ALP sei am Phosphattransport beteiligt.
Vor kurzem sind Versuchsergebnisse veröffentlicht worden, die auf eine Beeinflussung der Fettresorption durch die Darm-ALP hindeuten [27; 28; 29]. Die Abhängigkeit der Ossifizierung von der Knochen ALP ist ausführlich von Robison diskutiert worden [30].
Eine gewisse Bedeutung der ALP für die Calcifizierung wurde vorgeschlagen, da die Phosphataseaktivität im Knochen grob korreliert mit der physiologischen Aktivität der Knochen und mit der Anzahl der Osteoblasten [31]. Robison [30] hat zwei mögliche Aufgaben für die ALP vorgeschlagen:
1) Die Präzipitation von Calciumphosphat wird durch das lokale Auftreten hoher Konzentration an anorganischem Phosphat induziert, das auf die Phosphatase-Aktivität zurückzuführen ist, 2) Nach Entfernung von Pyrophosphat (durch die Wirkung der Pyrophosphatase), einem Inhibitor des Kristallwachstums, erlaubt das Enzym ein angemessenes Kristallwachstum.
Der Mechanismus der Knochenbildung muß jedoch ein wesentlich komplexerer und stärker kontrollierter Vorgang sein als sie eine einfache Präzipitation darstellt. Die Enzymaktivität ist normalerweise erhöht bei Kindern [32] und bei Patienten, die an Pagetscher Krankheit [33], Rachitis [34] oder an Hyperparathyroidose [35] leiden. Ein wesentlicher Hinweis auf die physiologische Rolle der ALP wurde durch die Entdeckung einer erblichen Kinderkrankheit -der Hypophosphatosimie aufgezeigt [36], bei der als Hauptsymptome ein abnorm niedriger ALP-Spiegel in allen Geweben und im Blutserum und eine schwere Schädigung der Knochenbildung - wie man sie ähnlich auch bei Rachitis beobachtet - auftreten.
Eine Untersuchung dieser Krankheit kann sich als sehr wichtig erweisen bei dem Bemühen, die tatsächliche Funktion der ALP herauszufinden.

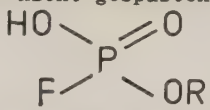
Substrat-Spezifität der alkalischen Phosphatase:

Wie bereits erwähnt wurde, klassifiziert man die gruppenspezifischen Phosphomonoesterasen vor allem nach dem pH-Optimum ihrer Wirkung. Was die Spezifität der ALP betrifft, so spaltet sie sehr viele, aber durchaus nicht alle - Phosphorsäuremonoester, wobei die Hydrolysegeschwindigkeit von Substrat zu Substrat verschieden ist. Die eigentliche von der ALP katalysierte Hydrolyse entspricht folgender allgemeiner Gleichung:

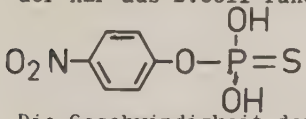


Durch die Spaltung der P - O Bindung entsteht freies Phosphat und Alkohol. Neben der Hydrolyse der P - O Bindung spaltet die ALP auch noch folgende Bindungen: P - F (Fluorphosphat)[37]; P - S (Cystein-Phosphat) [38]; P - N (Kreatin-N-Phosphat) [39].
Gegenüber dem Rest R zeigt die ALP keine Substratspezifität. Nur Phosphodiester und Phosphotriester werden nicht gespalten. Demgegenüber zeigte Fernley [39], daß die ALP gegenüber dem Phosphoryl-Rest eine große Spezifität besitzt. So werden die folgenden Phosphatester nicht gespalten:





Vor allem die Schwefelanaloga der normalen Phosphatester sind enzymatisch gut untersucht worden. Mit diesem Ergebnis stimmt die Beobachtung von Breslow [40] nicht überein, der eine Hydrolyse des P-Nitrophenyl-O-thiophosphat mit der ALP aus E.Coli fand.



Die Geschwindigkeit der Hydrolyse dieses Substrats, (Thiophosphatmonoester) ist langsamer als die des entsprechenden Phosphatmonoester. Neuman [38] die ebenfalls mit ALP aus E.coli arbeitete, fand keine enzymatische Hydrolyse dieses Substrats, doch isolierte sie einen sehr stabilen Enzym-O-Nitrophenyl-thiophosphat komplex. Neben der Aktivität als Monoesterase besitzt die ALP auch noch Pyrophosphatase- und Phosphotransferase-Eigenschaften (wie es auch für andere Phosphomonoesterasen beschrieben ist) [41, 42]. Untersuchungen der Transferase-Reaktion der ALP haben gezeigt, daß diese Reaktion wie die Hydrolyse von Monoestern abläuft, nur wird bei der Transferase-Reaktion der Phosphat-Rest statt auf Wasser, auf andere Akzeptoren des Typus ROH übertragen. Als Akzeptoren kommen vor allem Alkohole in Frage; z.B. Glycerin, TRIS, Glucose, Propandiol, usw. [43] Um eine meßbare Transferasewirkung zu erzielen, muß die Konzentration des Akzeptors relativ sehr groß sein. Dies macht es auch unwahrscheinlich, daß der Transferasewirkung eine biologische Funktion zukommt. Während einige Autoren [44-47] zeigten, daß die ALP eine Pyrophosphatase-Aktivität besitzt (z.B. Pyrophosphat, ADP, ATP) fanden andere Autoren [48-57] keine solche Aktivität bei ihren ALP-Präparaten. So besitzt die von Morton aus Kälberdünndarm isolierte Phosphatase keine Pyrophosphatase-Aktivität, sowohl gegenüber anorganischen als auch organischen Pyrophosphaten. Diese Ergebnisse wurden von Portman [45] bestätigt, der ebenfalls mit der ALP aus Kälberdünndarm arbeitete. Andere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß ALP aus verschiedenen Organen & E.coli nicht vollständig von der Aktivität gegenüber Pyrophosphatase-Aktivität trennbar ist. Selbst hochgereinigte menschliche ALP [48-49] sowie ALP isoliert aus Schweine-Niere [54] Schweine-Leber [56] und Kälberdünndarm [55] besitzt die Fähigkeit, Pyrophosphat zu hydrolysieren.

pH-Optimum:
Im allgemeinen sind Enzyme nur in einem bestimmten pH-Bereich aktiv und haben ein pH-Optimum. Einige Enzyme zeigen ziemlich scharfe pH-Optima. In diesen Fällen muß man den pH-Wert besonders sorgfältig einhalten. Bei anderen erstreckt sich das pH-Optimum über mehrere pH-Einheiten. Fast alle Enzyme sind empfindlich gegenüber stark sauren oder alkalischem Milieu, während bestimmte Enzyme wie z.B. Pepsin (pH-Optimum=2) bei neutralem pH-Werten sogar inaktiv sind. Das pH-Optimum eines Enzyms ist nicht unbedingt identisch mit dem pH seiner normalen intrazellulären Umgebung. diese kann sich auf dem auf- oder absteigenden Ast des Aktivitätsprofiles befinden. Eine charakteristische Eigenschaft von ALP ist die Art und Weise, in der das pH-Optimum sich mit der Anfangssubstrat-Konzentration, der Art des Puffers, der Art des Substrates und des Gewebes, aus dem das Enzym stammt, ändert. Bei jeder untersuchten ALP verschiebt sich das pH-Optimum bei zunehmender Substratkonzentration vom Neutralen fort. Der Puffer für die Aktivitätsmessung muß sehr sorgfältig gewählt werden(58 & 59). Normalerweise gebrauchte Pufferionen sind : 2-A-2M-P-1 , Ammediol Borat, Carbonat, Veronal, Äthanolamin und Tris. Veronalpuffer zersetzt sich bei 37°C und verliert seine Pufferkapazität. Hydroxyalkylaminpuffer können als Phosphorylakzeptoren auftreten und steigern damit die Substrat-Umsetzung. Ammoniumpuffer inhibieren ALP, besonders die aus der Placenta. Diese und andere Faktoren erschweren die Interpretation, der kinetischen Untersuchungen an der ALP. Obwohl in vitro Studien zeigen, daß das pH-Optimum der ALP-Enzyme zwischen 8,2 und 10,7 liegt, kann man annehmen, daß dieses Enzym auch in seiner natürlichen Umgebung bei physiologischem pH optimal aktiv ist. Bei niedrigen Substrat-Konzentrationen an -Glycerinphosphat , wie sie auch in der Zelle vorliegen, liegt das pH-Optimum der intestinalen ALP bei pH 7,35 (60) .

Aktivatoren und Inhibitoren :
Eine verwirrende Vielfalt von Effekten wurden bei der Addition von bivalenten Ionen auf die ALP-Aktivität nachgewiesen. ALP von verschiedenen Quellen kann durch bivalente Metallionen, meist durch Mg^{2+}-Ionen aktiviert werden und enthält außerdem im Enzym fest gebundenen Zink (45; 61 & 62). Die Ionen aktivieren bei niedrigen Konzentrationen, hemmen aber stark bei hohen Konzentrationen. Es gibt erst wenige Details über die Kinetik der Zink-Hemmung, die erstaunlich ist, angesichts der absoluten Notwendigkeit dieses Ions für die Enzymwirkung(63 &174) .

Die Aktivierung durch Magnesium-Ionen ist ausführlich untersucht worden, und man hat ihm viele verschiedene Funktionen zugeschrieben (64 & 65). Mg könnte eher die Zahl der aktiven Zentren erhöhen, als die Reaktionsgeschwindigkeit zu beschleunigen. Mg kann die Anlagerung von Zink an essentiellen Stellen erleichtern entweder dadurch, daß es dessen Funktion im aktiven Zentrum wiederherstellt oder daß es das Zn von einem Inhibierungszentrum entfernt (66) . Die Aktivierung von ALP durch Aminosäuren und durch eine Vielzahl von anderen Verbindungen (alles chelatbildner) kann auf einer Entfernung der inhibierenden Kationen beruhen und man kann so ebenfalls die Hemmung einiger Aminosäuren bei höheren Konzentrationen erklären. Die meisten Inhibitoren der ALP gehören zu folgenden Hauptgruppen: 1) Metallchelatisierende Agentien z.B. EDTA, O-Phenanthrolin und Cystein. Die Wiederherstellung der vollen Aktivität wird durch Dialyse oder Hinzugabe von Mg-oder Zn-Ionen erzielt. 2) Einige bivalente Kationen z.B. Be^{2+} oder Ca^{2+}. Be^{2+} verdrängt Mg^{2+} von unphosphorilierten Enzym(67). 3) Anionen z.B. Orthophosphat, Arsenat. Sie geben Kinetiken vom der kompetetiven Hemmung. Die Wirkung von Aminosäuren auf ALP ist ein Gebiet, das große Aufmerksamkeit errungen hat. Eines der interssentesten Ergebnisse dieser Arbeiten war, daß L-Phe ein organspezifischer und stereospezifischer Inhibitor der intestinalen und der placentalen ALP ist. Die Hemmung von intestinaler-ALP durch L-Phe ist stark von pH und Substratkonzentrationen abhängig und ist unkompetetiv (68).
L-Homoarginin ist ein spezifischer Inhibitor für Leber- und Knochen-ALP (69). In Bezug auf den Mechanismus der Inhibierung nahmen Fishman und Ghosh (70) ursprünglich die Bildung eines wenig dissozierenden Enzym-Inhibitor-Substratkomplexes(EIS) an, da die Hemmung unterhalb des Sättigungsbereiches sowohl von der Inhibitor als auch Substratkonzentration abhängig ist. In dem vorgeschlagenen Mechanismus liegt der Inhibitor zwischen der Metallbindungsstelle der Enzymmoleküls und der Phosphatgruppe des Substrates und verhindert so die Katalyse. Später Fishman und Sie (71) nahmen an , daß es eine hydrophobe Stelle nahe am aktiven Zentrum des Enzyms gibt, die vermutlich die hydrophobe Gruppe des Inhibitors binder. Die hydrophoben Bereiche verschiedener ALP-Isoenzyme sind vermutlich unterschiedlich, deswegen findet man eine ausgeprägte Spezifität der Isoenzyme für verschiedene Inhibitoren .

Fernley und Walker (72) nahmen an, daß der Inhibitor nur einen geringen Effekt auf die Reaktivität des Enzym-Substrat-Komplexes hat, aber er verhindert eine Spaltung des phosphorylierten Enzyms, das nach dem Freiwerden des organischen Anteils des Substrates aus diesem Komplex gebildet wird.

Lin et al (73) vermuteten, daß der Inhibitor die Reaktion beginnt, indem er mit dem Enzym-Substrat-Komplex reagiert und den Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex (ESI) bildet, der in den stabileren zwischenkomplex (EXI) übergeht, wobei die organische Hälfte des Substrates abgespalten wird.

Dieser Mechanismus stimmt mit den Tatsachen überein, daß die Hemmung sowohl von der Substrat- als auch von der Inhibitor-Konzentration abhängig ist ,

und auch mit dem Ergebnis von Fernley und Walker, die zeigten, daß der organische Anteil des Substrates in Gegenwart des Inhibitors abgespalten wird und einen stabilen EXI-Komplex bildet. Bei diesem Mechanismus wird vermutet, daß der Inhibitor sich zwischen die Phosphatgruppe des Substrates und die Lysin-Seitenkette des Enzyms schiebt. Eine neuere Untersuchung [74] brachte dagegen Ergebnisse, die den Mechanismus, indem L-Phe die Dephosphorylierung des Enzyms verhindert, stützen.

Kinetische Eigenschaften und Wirkungsmechanismus:

Bei der Untersuchung der ALP-Reaktionskinetik waren schon lange zwei komplizierende Faktoren bekannt, eine starke Hemmung durch das Produkt P_i und eine Hemmung bei hohen Substratkonzentrationen. Einige Forscher haben die Veränderung von V_{max} und K_m mit dem pH für ALP aus verschiedenen Organen untersucht. Zur Erklärung der Veränderung von K_m und V_{max} mit dem pH forderten FERNLEY und WALKER [39] die Existenz eines pH-abhängigen Gleichgewichtes zwischen zwei Enzymformen. Eine Form vereinigt sich mit anorganischem Phosphat und die andere nur mit Substrat. Es wurde vorgeschlagen, daß die Konformationsveränderung, die den Übergang zwischen den zwei Enzymformen begleitet, assoziiert ist mit einer Veränderung im pH von zwei basischen Gruppen des Enzyms. Für Darm-ALP zeigte Ghosh [70], daß die Schnittpunkte bei pH 8,6 und 9,6 im Dixonplot in Beziehung stehen zu funktionellen Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms. Wenn die aktive Stelle des Enzyms keine dissoziierbaren Gruppen einschließt, würde ein linearer Verlauf aus dem Plot K_m gegen pH resultieren. HIWADA und WACHSMUTH [75] berichteten, daß der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt für die Hydrolyse durch ALP aus Schweine-Niere in der gleichen Größenordnung für verschiedene Substrate liegt und zeigten, daß die Konformationsänderung eines phosphorylierten Enzymzwischenproduktes der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sein kann. Sie fanden, daß die funktionelle Gruppe des Enzyms wahrscheinlich ein pK von 8,7 besitzt, weil solch ein pK mit zwei verschiedenen Substraten gefunden wurde und weil seine Ionisation nicht durch die Vereinigung des Enzyms mit Substrat beeinflußt wird.
Einige dissoziierbare Gruppen werden als bedeutend für die ALP-Aktivität angesehen. Aus pH-Untersuchungen unterstrich MORTON [76] daß die Hydroxylgruppe eines Tyrosins oder die ε- Aminogruppe eines Lysinrestes essentiell für die enzymatische Aktivität der ALP aus Kälberdarm ist, konnte jedoch die beiden Gruppen wegen der Ähnlichkeiten in den pK-Werten nicht unterscheiden. In einer Untersuchung von FISHMAN und GHOSH [77] wird der Beweis vorgelegt, daß die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes an der Substratbindung beteiligt ist, während SH-Gruppe und Metallseite enger mit dem

katalytischen Vorgang verbunden sind. Die Gegenwart von Substrat schützt das Enzym gegen Inaktivierung durch Jodacetamid und Jod und sie zeigten damit, daß die SH-Gruppe für die Bindung des Substrates von Bedeutung ist. Die Hemmung des Enzyms durch O-Methyl-Isoharnstoff um etwa 60 % wird von Fishman und Ghosh interpretiert, daß eine ε-Aminogruppe nur bei der Bindung beteiligt ist und nicht direkt in die katalytische Wirkung eingreift. FERNLEY [39] hat die Notwendigkeit der SH-Gruppen in Frage gestellt, weil zu hohe Konzentrationen an SH-Reagentien für eine Enzymhemmung erforderlich sind.
Untersuchungen über die Bindung vor markiertem anorganischem Phosphat auf dem Enzymmolekül zeigen, daß die primäre OH-Gruppe eines Serinrestes im aktiven Zentrum des Enzyms eingeschlossen ist [22; 78]. Der pK einer Serinhydroxylgruppe von 12,5 ist weit entfernt von den pK-Werten dissoziierbarer Gruppen, die im aktiven Bereich der ALP vorkommen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Hydroxylgruppe eines Serinrestes als Phosphorylakzeptor dienen kann und nicht als energiereiches Zwischenprodukt. Obgleich die genaue Reihenfolge der katalytischen Schritte der ALP noch untersucht wird, wurden viele kinetischen Schemata vorgeschlagen. Die Reaktion verläuft in zwei Phasen; 1) Nach Bildung des Enzymsubstratkomplexes und Hydrolyse des Substrates entsteht Phosphorylenzym und Produkt und 2) aus dem Phosphorylenzym entsteht Enzym und anorganisches Phosphat.

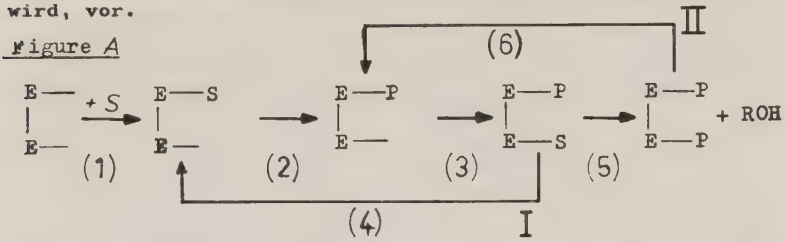
Frühere Arbeiten von MORTON und ENGSROM [76; 78] haben gezeigt, daß die durch ALP katalysierte Reaktion über die intermediäre Bildung eines Phosphoenzyms verläuft. Diese Vermutung wird durch eine vielzahl von Beweisen unterstützt, die mit ALP's aus E.coli und Kälberdarm erhalten wurden und bei denen mit radioaktiv-markiertem anorganischem Phosphat oder Glucose 6-Phosphat [72; 57] mit Rapid flow quenching und Stopped flow-Methoden gearbeitet wurde. Einen zusätzlichen Beweis für ein Phosphorylenzymzwischenprodukt fanden LAIDLER und Mitarbeiter [79; 89], als sie die Kinetik der Reaktion in Gegenwart anderer Nukleophile außer Wasser untersuchten. Das einfachste kinetische Schema, das auf ALP anzuwenden ist, sieht folgendermaßen aus: [81; 82]

$$E + ROPO_3^{2-} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E...ROPO_3^{2-} \xrightarrow{k_2} E\text{-}OPO_3^{2-} \xrightarrow[\substack{H_2O \\ \text{oder} \\ R'OH}]{k_3} E + \underset{\substack{\text{oder} \\ R'OPO_3^-}}{HPO_4^{2-}}$$

Darin steht E für den aktiven Bereich des Enzyms, $E...ROPO_3^{2-}$ als nicht kovalenter Komplex, der sich mit dem Substrat bildet, und $E\text{-}OPO_3^{2-}$ für das Enzym, das am Serinrest phosphoryliert ist. Die Geschwindigkeitskonstanten entsprechen nicht notwendigerweise wie oben angeführt wurde einem einzigen Reaktionsschritt. Z.B. kann K_3 sowohl an der Bindung des Wassers, der Überführung von Phosphat und der Freisetzung von anorganischem Phosphat ebenso wie an

einem möglichen Isomerisierungsschritt beteiligt sein. Die Tatsache, daß ALP in gewissen Grenzen verschiedene Substrate mit nahezu gleicher Geschwindigkeit hydrolysiert, ist ein Anzeichen für das Auftreten eines einzigen Zwischenproduktes, das geschwindigkeitsbestimmend ist. Eine geschwindigkeitsbestimmende Konformationsveränderung des Enzyms, die durch das Substrat vor der Phosphorylüberführung induziert wird, wurde ebenfalls vorgeschlagen. Eine ausführliche Erklärung der katalytischen Vorgänge bei der Reaktion der ALP wurde kürzlich von LAZDUNSKI und Mitarbeitern [83] diskutiert. Sie schlugen einen "Flip Flop" Mechanismus für die Reaktion, die durch ALP katalysiert wird, vor.

Figure A



E steht darin für den freien aktiven Bereich, E-- S zeigt die nicht kovalente Bindung des Substrates und E - P stellt die kovalente Phosphorylierung des essentiellen Serinrestes dar.
Dieser Reaktionstyp wurde hauptsächlich zur Erklärung der kinetischen Resultate aufgestellt, die Mithilfe von ALP aus Kälberdarm und aus E.coli erhalten wurden, hauptsächlich wegen der sehr verschiedenen Phosphorylierungsgeschwindigkeiten der zwei aktiven Bereiche bei saurem pH und wegen der half-site-Reaktivität bei alkalischem pH. In diesem Mechanismus ist die Kupplung zwischen den Untereinheiten nicht nur bei dem Substratbindungsschritt zu beobachten, sondern auch während der katalytischen Transformation des Substrats (Phosphorylierung und Dephosphorylierung). Zwei steady-state-Zyklen wurden vorgeschlagen, um sowohl die Michaeliskinetiken als auch die "Half of the sites" Reaktivität zu erklären. Sie sind dargestellt als I und II in Figur A. Half of the sites Reaktivität ist zu beobachten, wenn Schritt 4 im Zyklus I/ bzw. Schritt 5 in Zyklus II geschwindigkeitsbestimmend ist. Half of the sites Reaktivität wäre in beiden Zyklen zu beobachten, wenn Schritt 3 geschwindigkeitsbestimmend ist, vorausgesetzt Schritt 3 umfaßt sowohl die Bindung von Substrat als auch eine langsame Konformationsänderung der freien Untereinheit. Anreicherung des diphosphorylierten Derivates unter seady-state-Bedingungen bei saurem pH bedeutet, daß unter diesen Bedingungen Schritt 6 in Zyklus II geschwindigkeitsbestimmend ist. Alle Schritte, die in dem Mechanismus auftreten, schließen auch Konformationsveränderungen ein. Die Geschwindigkeit der Schritte 3, 4 oder 5 wird wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung kontrolliert,

die die Enzymstruktur des Enzymsubstratkomplexes beeinflußt. Magnesiumionen scheinen die Konformationsveränderungen innerhalb einer Untereinheit oder zwischen den Untereinheiten, die für die Katalyse notwendig sind, beträchtlich zu beschleunigen [84]. Die Phophorylierung der Untereinheit in Schritt 2 erzeugt eine Konformationsänderung zwischen den Untereinheiten, die die Bindung von S an der zweiten Untereinheiten im Schritt 3 zuläßt. Dieser hybride Komplex (P-E-E-S) kann dann sowohl die Substratbindung an der zweiten Stelle (Schritt 3) mit einer Dephosphorylierung der ersten Stelle (Schritt 4) kuppeln - typischer Flip-Flop-Mechanismus - als auch die Phosphorylierung der zweiten Stelle (Schritt 5) mit der Dephosphorylierung einer von den zwei Stellen (Schritt 6) kuppeln.

Der Flip-Flop Schritt schließt notwendigerweise die gleichzeitige Phosphorylierung der einen Stelle und Dephosphorylierung der anderen ein.
Auch andere Enzyme mit sehr komplexen katalytischen Funktionen sind bekannt, deren Katalysemechanismus nach der "half of the sites Reaktion" ablaufen soll. Dazu gehören ADH, MDH, GAPDH aus Muskel, CTP-Synthetase und Glutamin-Synthetase.

2. Die molekulare Basis der Isoenzym-Systeme:

(Multiple molekulare Enzymformen)

Die molekulare Heterogenität von Enzymen wurde auf Verunreinigungen oder auf teilweise denaturierte oder abgebaute Enzymmoleküle zurückgeführt [85]. In den fünfziger Jahren wurde zum ersten Mal die Ansicht vertreten, daß diese Heterogenität nicht nur auf Artefakten beruhe, sondern durchaus die Realität im Zellgeschehen widerspiegeln könne. [86, 87]
Markert und Möller 1959 [88] bezeichneten ein Isoenzym als ein weit verbreitetes enzymologisches Phänomen von biologischer Bedeutung. Sie schlugen vor, Isoenzyme zu definieren, als enzymatisch aktive Proteine, die die gleiche Reaktion katalysieren und in der gleichen Art vorkommen, die aber unterschiedliche biochemische und physikalische Charakteristika aufweisen.
Isoenzyme wurden bei vielen verschiedenen Enzymen gefunden und in vielen Organismen wie z.B. Bakterien, Protozoen, beim Mais, bei Drosophila und bei Säugetieren und dem Menschen. Einige Isoenzyme zeigen Unterschiede, die artspezifisch, gewebespezifisch und spezifisch bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation sind, und deren Veränderung sich auf vorher bestimmbare Art und Weise mit dem Entwicklungsgrad und mit dem Erreichen bestimmter Krankheitsstadien vollzieht.
Für das Studium gewebe- und artspezifischer Unterschiede isofunktioneller Proteine wurden viele verschiedene biochemische und physikalische Techniken verwendet. Bei den meisten dieser Methoden, z.B. der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung, der Aminosäuresequenz und bei Benutzung der Fingerprinttechnik werden reine Präparationen dieser Proteine benötigt.
Die Entdeckung und die Aufklärung multipler molekularer Enzymformen war in erster Linie abhängig von der Weiterentwicklung der Techniken in der analytischen Proteinchemie. Die sukzessiven Anwendungen des Ionenaustausch-Verfahrens, der Gelfiltration, besonders aber der Stärkeblock und Gelelektrophorese haben zu grundlegenden Einblicken in die genetische Kontrolle, die Struktur und die Funktion einer großen Zahl von Enzymen geführt. Eine andere wirkungsvolle Technik ist die isoelektrische Fokussierung, die oft zur Aufklärung von Isoenzymsystemen Anwendung findet, bei denen andere Methoden keinen Erfolg brachten.
Die immunchemische Spezifität, die von der Struktur des Antigens abhängt, offeriert eine weitere Möglichkeit zum Vergleich isofunktioneller Proteine und Enzyme. Eine solche Analyse kann schnell durchgeführt werden und es können Rohextrakte des Gewebes verwendet werden, falls ein reines Protein oder Enzym für die Herstellung des Antiserums angewandt

wurde. Ein Bericht der IUPACIUB Kommission für Biochemische Nomenklatur sprach folgende Empfehlung aus:

1) Der Ausdruck "multiple Enzymformen" soll als umfassende Bezeichnung verwendet werden; er soll sich auf alle Proteine beziehen, die die gleiche enzymatische Aktivität besitzen und die in der gleichen Art vorkommen.

2) Der Ausdruck "Isoenzym" soll Anwendung finden für diejenigen multiplen Formen, die aufgrund eines genetisch festgelegten Unterschiedes in der Primärstruktur entstehen und nicht für solche multiple Formen, die durch Modifikation der gleichen Primärstruktur gebildet werden.

Der Terminus Isoenzym soll in dieser Arbeit wegen operationeller Nützlichkeit folgendermaßen definiert werden: Ein katalytisch aktives Protein, das biochemisch und physikalisch von anderen Proteinen der gleichen Enzymspecies unterscheidbar ist.
Die Ursachen für die Entstehung von Isoenzymen können vielfältig sein. Sie gliedern sich erst einmal in folgende zwei Kategorien: Genetische (oder synthetische) und nichtgenetische (oder postsynthetische) Isoenzyme.

1) Genetische oder synthetische Heterogenität: Gene kontrollieren die Spezifität von Enzymen durch Festlegung der linearen Anordnung von Aminosäuren, die einzelne Polypeptidketten bilden. Sie regulieren die Bildung dieser Ketten entweder durch An- oder Ausschalten der Transkription, oder durch Einwirkung auf die Translation.
   A) Die einfachste genetische Basis für Isoenzyme ist ein einzelnes Gen, das die Kodierung des Enzyms übernimmt. Sobald die Primärstruktur der Polypeptidkette gebildet ist, kann sie modifiziert werden, um zwei oder mehr molekulare Varianten zu liefern.
   B) Multigenische Isoenzyme: Sie können in zwei Typen eingeteilt werden: a) allelische Isoenzyme: jedes Isoenzym steht unter der Kontrolle eines kodominanten allelischen Gens. In solchen Fällen werden in Heterozygoten mindestens zwei Isoenzyme gebildet. Solche Isoenzyme sind immunchemisch nicht voneinander unterscheidbar und scheinen eine genau gleiche Substratspezifität zu besitzen und sind auch in anderer Hinsicht ähnlich. b) Nicht allelische Isoenzyme: Zwei oder mehr Isoenzyme, die durch zwei oder mehr Gene an verschiedenen Loci kontrolliert werden. Solche Isoenzyme sind im allgemeinen voneinander unterscheidbar und, falls sie Polymere bilden, entstehen die Hybridmoleküle durch zufällige Assoziation wie bei der LDH. (Zufälliger Zusammenschluß verschiedener Untereinheiten: Proteine, die in multiplen Verbänden aus zwei oder mehr Polypeptidketten bestehen, können aus allen nur möglichen Kombinationen der verschiedenen Polypeptidketten gebildet werden. Die eigentlichen

Isoenzyme fallen in diese Kategorie.
Die nicht allelischen Isoenzymformen, die von getrennten Genen kontrolliert werden, zeigen nicht nur Unterschiede in Bezug auf ihre elektrophoretische Beweglichkeit, sondern auch in ihrer Hitzeempfindlichkeit und in anderen Eigenschaften.
Beispiele: Die Isoenzyme der LDH unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht, abgesehen von den Unterschieden in der Nettoladung, die die Basis für ihre Trennung durch Elektrophorese oder Chromatographie bilden. Strukturelle Studien an den getrennten Isoenzymen haben gezeigt, daß die Bildung eines aktiven LDH-Moleküls durch Kombination zweier verschiedener Polypeptid-Untereinheiten in Gruppen zu je vier erfolgt. Eine genetische Variation der LDH (M) und (H) Untereinheiten ist beim Menschen und anderen Species beschrieben worden; die Existenz weiterer LDH'Isoenzyme könnte somit gegeben sein, d.h. Isoenzyme, die durch das Vorhandensein multipler Allele an einem bestimmten Genlocus bedingt werden. Ein anderes Beispiel für ein Enzym, das durch mehrere Genloci festgelegt wird, ist die Phosphoglucomutase. 3 verschiedene Gruppen von PGM-Isoenzymen können aus menschlichen Geweben durch Elektrophorese getrennt werden; sie sind auf die Existenz dreier verschiedener Genloci zurückzuführen. Eine allelische Variation gibt es an jedem der drei Genloci. Diese bewirkt eine noch größere elektrophoretische Heterogenität dieses Enzyms.

2) Nichtgenetische oder postsynthetische Heterogenität:
Gewisse multiple molekulare Enzymformen beruhen offensichtlich nicht auf genetisch festgelegten Unterschieden in der Primärstruktur. Diese sekundären oder abgeleiteten Isoenzyme sind im allgemeinen nicht so bedeutend oder so interessant wie die Isoenzyme genetischen Ursprungs, aber die Kenntnis ihrer Existenz kann bei der Interpretation von Isoenzymmustern wichtig sein. Die Modifikation der Polypeptide beginnt mit dem Abschluß der Translation (und in einigen Fällen schon vorher). Diese Veränderung kann bewirkt werden durch:

a) Änderung der kovalenten Struktur des ursprünglichen Enzyms mit konsequenter Änderung der Nettoladung oder anderer Eigenschaften, z.B.
1) Abspaltung N-terminaler Aminosäurereste.
2) Oxidation von Sulfhydrylgruppen: z.B. Saure Phosphatase der Erythrozyten und Adenosin-Desaminase.
3) Abspaltung von Kohlehydratketten: Eine schrittweise Entfernung von Zuckerresten kann in Glykoproteinen Heterogenität bewirken.
4) Kombination mit unterschiedlichen Anteilen an Nichtprotein-Material wie Sialinsäure in Glycoproteinen, Lipide und Salze.

5) Desaminierung: Der Verlust einzelner Amidogruppen geschieht aufgrund der unterschiedlichen Stabilität von Glutaminyl- und Asparaginylgruppen. Die Desamidierung ist wohl eine der häufigsten Ursachen für eine Heterogenität reiner Proteine.
Die Desamidierung in vivo: Beisp.: Aldolase (A) aus adulten Kaninchen enthält zwei verschiedene Untereinheiten, die in Gegenwart von 8M Harnstoff chromatographisch getrennt werden können [89]. Das Enzym, das in der Disk-Elektrophorese einheitlich wandert, wird durch die Desamidierung eines einzigen Asparaginrestes festgelegt [90], was zu einer rein zufälligen Verteilung der Tetramere führt, die dann 0 bis 4 desamidierte Untereinheiten enthalten. Robinson et al [91]. stellten fest, daß die Desamidierung weitgehend von der Primärstruktur abhängt. Sie sagten, daß die erste Desaminierung unter Sequenzkontrolle erfolgt, die zweite Desaminierung aber schneller als erwartet vor sich geht und daß sie durch die Tertiärstruktur bewirkt wird.
6) Spaltung von Peptidbindungen durch Protease
Die enzymatische Spaltung von Proteinen schließt die Beseitigung ganzer Reste oder Gruppen ein. Dies beinhaltet natürlich nur das Aufspalten einer begrenzten Anzahl von Peptidbindungen, da ausgedehnte Bindungsspaltungen den Verlust der enzymatischen Aktivität nach sich ziehen würden.
B) Nichtkovalente Modifikation von Enzymen: a) Aggregation von Enzymmolekülen zur Bildung von Komplexen. b) Konformationsisomerie oder Allomorphismus. Es steht fest, daß die Primärstruktur der Polypeptidketten allein für die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine maßgeblich ist. Normalerweise ist dies eine außergewähnlich stabile Konformation. Die Konformationsvarianten sind verschieden von allen multiplen Formen, in dem ihre Verursachung keine Unterschiede in den kovalenten Strukturen der Moleküle oder feststellbare Änderungen ihrer Molekulargewichte bedingt. Die einzigen Unterschiede unter den Konformationsvarianten oder "Conformeren" können in den verschiedenen Möglichkeiten der Faltung der Polypeptidketten bestehen. Beisp.: Mitochondriale Malat-Dehydrogenase. Obwohl die Conformeren-Hypothese vorteilhaft ist, ist bisher keine reproduzierbare Bestätigung für die Überführung einer Form in eine andere nicht erbracht worden, und es ist noch kein vollständig nachgewiesenes Beispiel dieses Phänomens beschrieben worden.
7) Artefakte. Es ist möglich, daß bei einer elektrophoretisch ausgeführten Isoenzym-Analyse Artefakte auftreten. Verunreinigungen der Substrate und anderer Reagentien können ebenso zu einer irrtümlichen Interpretation in Bezug auf die Anzahl der in einem

gegebenen Gewebe vorhandenen Isoenzyme führen. MIKROHETEROGENITÄT ist ein geeigneter Terminus für all diese verschiedenen Formen postsynthetischer Heterogenität.
Falls man Isoenzyme als multiple Formen eines in einem Organismus vorkommenden Enzyms definiert, paßt die artifiziell entstehende Heterogenität nicht in diese Definition. Es ist deshalb sehr schwierig zu entscheiden, ob die multiplen Enzymformen eines gegebenen Enzyms in vivo oder in vitro entstehen, oder mit anderen Worten, ob die Heterogenität, die man in einer fertigen Präparation vorfindet, überhaupt die Heterogenität im nativen Zustand in der Zelle widerspiegelt.

Die Tatsache, daß viele Enzyme bereits in zwei oder mehr Isoenzym-Formen aufgetrennt wurden, läßt jedes andere Enzym zum Gegenstand der Erforschung molekularer Heterogenität werden.

Die Funktion der Isoenzyme:

Organismen synthetisieren im allgemeinen viele ihrer Enzyme in mehreren verschiedenen molekularen Formen, vermutlich um spezialisierten Erfordernissen des Stoffwechsels nachkommen zu können. Untersuchungen über die zelluläre Regulation verschiedener Stoffwechseltätigkeiten haben zur Entdeckung einiger Isoenzyme geführt, deren Funktionen eindeutig regulatorischen Prozessen zuzuordnen sind. Es scheint allgemein so zu sein, daß Isoenzyme mit regulatorischen Funktionen immer dann entstanden sind, wenn eine gegebene enzymatische Reaktion für mehr als einen Stoffwechselprozeß benötigt wird.

Die Existenz dieser Isoenzyme wurde zuerst von Umbarger et al. erkannt [92]. Sie formulierten diesen Sachverhalt wie folgt:
Wo immer in einer Zelle eine chemische Reaktion von einem Enzym katalysiert wird, dessen Bildung und Aktivität unter strenger Repressionskontrolle und Endprodukthemmung stehen, wird von der Zelle ein weiteres Enzym benötigt, wenn diese Reaktion in der Zelle noch eine weitere wichtige Rolle zu spielen hat.
In vielen Fällen ist es nicht möglich zu entscheiden, ob die Existenz multipler Enzymformen irgendeinen Vorteil für den Organismus bedeutet oder ob diese Isoenzyme nur evolutionäre Zufälle sind, die von einer Generation zur anderen beibehalten wurden, und zwar ohne natürlichen Selektionsdruck, der ihre Existenz begünstigt oder erschwert hätte.
Bei einigen Isoenzymen, z.B. der LDH und der Aldolase, deuten ihre gewebsspezifische Lokalisation und die Änderungen der relativen Proportionen während der Entwicklung auf eine Anpassung an wechselnde Stoffwechselmuster hin.
Der LDH-M Typ zeigt katalytische Eigenschaften, die geeigneter sind als diejenigen der H-Isoenzyme für eine Katalyse unter Bedingungen, bei denen das Substrat (Pyruvat) sich an-

häuft. Solche Gewebe, die ein anaerobes Stoffwechselmuster besitzen (Skelettmuskel), scheinen reich an LDH-M zu sein.

Aldolase B ist aktiv gegenüber Fructose-1-Phosphat und ist deshalb an die Gluconeogenese angepaßt, einem wichtigen Prozeß in der Leber, in der dieses Isoenzym verbreitet ist, wohingegen das im Muskel vorherrschende Isoenzym A aktiver ist in der Spaltung des Fructose-1,6-Diphosphates, d.h. seine Wirkung ist günstig für die Glykolyse.

Unterschiedliche Eigenschaften von zytoplasmatischen und mitochonarialen Isoenzymen scheinen auch Anpassungen an die verschiedenen funktionellen Notwendigkeiten der jeweiligen subzellulären Kompartimente darzustellen. Z.B. die mitochondrialen und extramitochondrialen Isoenzyme der Malat-Dehyerogense und Aspartat-Transaminase.
Das Vorkommen von Isoenzymen in verschiedenen Stoffwechselkompartimenten wird wahrscheinlich durch eine spezifische Verteilung von Ladungen über die Moleküloberfläche ermöglicht. Stoffwechselkompartimentierung wird wohl am besten bei solchen Isoenzymen verdeutlicht, die gemeinsame Schritte in verzweigten Biosynthesewegen katalysieren, welche zur Bildung zweier oder mehrerer Endprodukte führen. Ein gemeinsames regulatorisches Merkmal solcher Stoffwechselwege ist die Gegenwart von Isoenzymen mit unterschiedlichen Beeinflußbarkeiten in Bezug auf eine Endproduktkontrolle.

Eine der zahlreichen biologischen Anwendungen enzymatischer Heterogenität ist ihre Verwendung in der Diagnose.
Dem Biochemiker haben sie einen tieferen Einblick in die Kontrolle und in die Regulation des Intermediärstoffwechsels vermittelt. Dem Genetiker lieferten sie eine empfindliche Technik zur Entdeckung neuer polymorpher Systeme, um Chromosomen zu maskieren, und zur Verfolgung ihrer Aktionswechsel. Für die Ontogenie und die Phylogenie werden sie als Marker verwendet.

3. Enzyme und Diagnostik:

Das Vorhandensein geringer Enzymaktivitäten im Humanserum wurde als normale Erscheinung vorgefunden, obwohl die meisten dieser Enzyme bekanntlich einen intrazellulären Ursprung haben.
Wenn jedoch die Gewebe durch Krankheit zerstört sind, diffundieren die intrazellulären Enzyme in das Serum und verursachen erhöhte Enzymaktivitäten, verglichen mit den Normalwerten im Serum.
Mit fortschreitender Kenntnis und Erfahrung wurden die Erhöhungen der Enzymaktivitäten im Serum mit den Gewebezerstörungen bei bestimmten Krankheiten korreliert.
Eine solche Information hat die klinische Enzymologie für diagnostische, prognostische und therapeutische Zwecke sehr nützlich gemacht.
Die enzymatische Krankheitsdiagnose kann wegen der Ähnlichkeit der Verteilungen der Enzyme in den verschiedenen Geweben erschwert werden; es gibt jedoch in den meisten Geweben Isoenzymformen, die sich von Gewebe zu Gewebe unterscheiden lassen. Daher begannen viele Arbeitsgruppen nach organspezifischen Enzymen zu suchen.
Die klinische Bedeutung der Isoenzymforschung basiert auf der Gültigkeit von zwei Voraussetzungen:

1. Es müssen Unterschiede zwischen den Isoenzymen in den verschiedenen Geweben des Körpers bestehen.
2. Diese Unterschiede müssen bestehen bleiben und nachgewiesen werden können, nachdem diese Enzyme aus ihren ursprünglichen Geweben als Folge der Krankheit in den Blutstrom abgegeben worden sind.

Das erste Enzym, dessen diagnostischer Wert untersucht wurde, war wahrscheinlich die ALP [5]. Die Enzyme ALP, GOT, GPT und LDH werden zur Zeit in den klinischen biochemischen Laboratorien am häufigsten gemessen. Die Verwendung vieler anderer Enzyme in der klinischen Diagnostik wird jedoch derzeit intensiv beim Menschen erforscht. Z.B. eine erhöhte Aktivität der (OCT) im Serum wurde als spezifischer Indikator für eine Leberzellen-Nekrose und eine erhöhte Aktivität der (CPK) als spezifischer Indikator bei Zerstörung des Muskelgewebes nachgewiesen. Es wurde gefunden, daß die Gamme-Glutamyl-Transpeptidase ein viel empfindlicherer Indikator für eine Lebererkrankung ist als die GOT, GPT oder ALP. Der eindrucksvolle technische Fortschritt in der Instrumentation hat inzwischen die Bestimmung der Serumenzyme einfach und zuverlässig werden lassen, und für eine große Zahl von diagnostischen Enzymen wurden pathologische Werte ermittelt. Bei sorgfältiger Kombination der Testmöglichkeiten ist der klinische Chemiker nun in der Lage, einen wesentlichen Beitrag zur Differentialdiagnose einer Krankheit zu liefern.

GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LDH = Iactat-Dehydrogenase
ALP = Alkalische Phosphatase
CPK = Creatin-Kinase
OCT = Ornithin-Carbamyl-Transferase

Theoretische Betrachtungen: Die Enzyme im Serum gliedern sich in zwei Gruppen:

I. Serumspezifische Enzyme; diese Enzyme erscheinen im Serum in hoher, in den Geweben in geringer Aktivität. Ihr Serumspiegel ist eine Funktion ihrer Produktion im Ursprungsorgan und der Geschwindigkeit ihrer Entfernung aus dem Blut. Die Enzyme der Blutgerinnung gehören in diese Gruppe.

II. Enzyme, die nicht serumspezifisch sind: Diese Enzyme sind keine funktionellen Bestandteile des Blutes; für sie sind die entsprechenden Coenzyme und manchmal auch die notwendigen Substrate im Serum nicht vorhanden. Diese Enzyme können weiterhin aufgrund ihrer physiologischen Funktion in Exkretionsenzyme und in Enzyme des Zellstoffwechsels unterteilt werden. Die Enzyme der Exkretion werden spezifisch von exkretorischen Drüsen synthetisiert, und sie sind funktionelle Bestandteile der Drüsensekrete. Die ALP der Gallen und die saure Phosphatase der Prostataflüssigkeit sind Beispiele für diese Gruppe. Die physiologischen Funktionen dieser Enzyme sind extrazellulär.

Die Enzyme des Zellstoffwechsels gliedern sich in

a) Organspezifische Enzyme, die in Leber, Niere und in anderen Organen vorkommen. Sie sind das Ergebnis der während der Entwicklung abgelaufenen Differenzierung und sind wesentliche Bestandteile organspezifischer Funktionen.
b) Nicht organspezifische Enzyme der Zellatmung (die man in allen Zellen findet), des Aminosäurestoffwechsels, des Stoffwechsels der Fette und der Kohlehydrate. Diese Gruppe umfaßt die Enzyme des Intermediärstoffwechsels.

Sie katalysieren die Hauptreaktionen des Energie- und Substratumsatzes, und sie sind in allen Organismen und Zellen in hoher Konzentration vorhanden. In der Leber können diese Enzyme2/3 der gesamten Zellproteine ausmachen.

Faktoren, die die Enzymspiegel in extrazellulären Flüssigkeiten beeinflussen..

Zellen sind Gleichgewichtssysteme und ihre Komponenten, wie Zellwände, Kerne und Mitochondrien, werden durch thermodynamisch reversible katabolische und anabolische

Reaktionen aufrechterhalten. Es ist anzunehmen, daß die Enzyme während dieser Prozesse in die extrazellulären Flüssigkeiten gelangen. Wenn keine pathologischen oder extremen Bedingungen vorliegen, verschwinden die Enzyme aus dem Serum etwa so schnell, wie sie aus den Geweben nachgeliefert werden.
Die normalerweise niedrigen Enzymspiegel in den Plasma- und Gewebeflüssigkeiten sind das Ergebnis einer Balance zwischen mehreren Faktoren: Das Ausmaß, in dem die Enzyme in den Zellen synthetisiert und entlassen werden, wird bestimmt von den Geschwindigkeiten, mit denen sie durch Inaktivierung und Abbau oder Exkretion aus der extrazellulären Flüssigkeit entfernt werden. Die Gegenwart von Substanzen in der extrazellulären Flüssigkeit, die die Enzymwirkung aktivieren oder inhibieren, beeinflußt auch den Aktivitätsspiegel.

Im Falle einer Störung der anabolischen Funktion wird die Ökonomie der Zelle unterbrochen. Die Organzellen und Membranen werden nicht mehr aufrechterhalten, und der Inhalt der Zelle diffundiert mit höherer Geschwindigkeit als unter normalen Bedingungen in die extrazellulären Flüssigkeiten. Der Mechanismus, durch den die Enzyme aus dem Serum entfernt werden, scheint diese Änderung nicht zu kompensieren mit der Folge der Erhöhung des Enzymspiegels im Serum. Viele Faktoren können die Permeabilität der Zellmembranen erhöhen und somit den Austritt intrazellulärer Enzyme verursachen. Diese Faktoren umfassen die Einschränkung der Sauerstoffversorgung der Zelle, das Aufbrauchen der zirkulierenden Glucose und die Anwesenheit verschiedener Drogen und chemischer Verbindungen, die die Glykolyse, den Citronensäurezyclus oder die oxidative Phosphorylierung blockieren und damit die Rolle der Energieproduktion bei der Aufrechterhaltung wirkungsvoller Barrieren unterstreichen.
Unter anaeroben Bedingungen oder bei Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung findet eine erhöhte Glykolyse statt. Ein Abfallen der ATP-Konzentration führt zu Änderungen im Wassergehalt der Zelle, was ein Anschwellen der Zellen verursacht. Dieser Vorgang führt zu einer Permeabilitätsstörung, die wahrscheinlich auf ein Öffnen der Zellporen zurückzuführen ist. Dies führt zum Verlust löslicher zytoplasmatischer Bestandteile wie Metaboliten, Elektrolyten oder Enzymen. Ein solcher Prozeß kann mit dem Tod der Zelle enden. Zusätzlich können infektiöse Agentien, bakterielle Gifte oder Viren direkt auf die Zellmembran einwirken, während eine genetisch determinierte Fehlerhaftigkeit der Membranstruktur zu einem bestimmten Krankheitsprozeß, z.B. Muskeldystrophie, führen kann.
Das Austreten der Moleküle aus der Zelle kann reversibel sein oder kann in ein irreversibles Stadium übergehen.
Ein Beispiel für einen reversiblen Prozeß ist der Austritt der Aldolase aus den Muskelzellen während einer anstrengenden Übung. Wenn der Enzymaustritt beginnt, beeinflußen drei

Faktoren die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Enzyme in der austretenden Flüssigkeit erscheinen.

1. der Konzentrationsgradient über der Zellmembran, der die treibende Kraft für den Enzymaustritt darstellt. Das Gefälle des Gradienten ist für die verschiedenen Enzyme und auch für verschiedene Zelltypen unterschiedlich. Bei Leberzellen ist die LDH-Konzentration in der Zelle etwa 3000-fach höher als die extrazelluläre Konzentration, aber nur 200-fach höher in den Erythrozyten. Die intra-/extrazellulären Aktivitätsverhältnisse bei Leberzellen können
   50000 : 1 für die Sorbitdehydrogenase
   20000 : 1 für die ADH und
   10000 : 1 für die Asparat-Transaminase und Alanin-Transaminase sein.

Enzyme mit höheren Konzentrationsgradienten treten im allgemeinen schneller aus den Zellen aus als diejenigen mit niedrigeren intra-/extrazellulären Verhältnissen.

2. Der zweite Faktor ist die Größe der Enzymmoleküle selbst (Molekulargewicht). Die Austrittsgeschwindigkeiten der Enzyme sind umgekehrt proportional zu ihren Molekulargewichten.

3. Der dritte Faktor ist die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme.
   Wie es zu erwarten ist, treten die zytoplasmatischen Enzyme am leichtesten aus den Geweben aus. Mitochondriale Enzyme brauchen jedoch längere Zeit für den Austritt aus den Geweben.
   Der Austritt von Enzymen in die extrazelluläre Flüssigkeit ist ein hochempfindlicher Hinweis auf die Zerstörung der Zellmembran, da Enzyme aufgrund ihrer katalytischen Aktivität nachgewiesen werden können, auch wenn sie in Konzentrationen vorhanden sind, die für eine Bestimmung mit anderen Mitteln zu niedrig sind.

diejenigen mit niedrigeren intra-/extrazellulären Verhältnissen.

2. Der zweite Faktor ist die Größe der Enzymmoleküle selbst (Molekulargewicht). Die Austrittsgeschwindigkeiten der Enzyme sind umgekehrt proportional zu ihren Molekulargewichten.

3. Der dritte Faktor ist die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme.
   Wie es zu erwarten ist, treten die zytoplasmatischen Enzyme am leichtesten aus den Geweben aus. Mitochondriale Enzyme brauchen jedoch längere Zeit für den Austritt aus den Geweben.
   Der Austritt von Enzymen in die extrazelluläre Flüssigkeit ist ein hochempfindlicher Hinweis auf die Zerstörung der Zellmembran, da Enzyme aufgrund ihrer katalytischen Aktivität nachgewiesen werden können, auch wenn sie in Konzentrationen vorhanden sind, die für eine Bestimmung mit anderen Mitteln zu niedrig sind.

Isoenzymstudien im Serum oder im Plasma bringen zwei Vorteile mit sich:

1. Es kann gezeigt werden, daß der Isoenzymtyp oder die Isoenzymmuster im Serum denen eines bestimmten Gewebes oder Organs ähneln, das so als Ursache der abnormen Enzymaktivitäten im Serum identifiziert werden kann.
2. Es kann möglich sein, das Vorhandensein eines nicht normalen Isoenzymmusters im Serum nachzuweisen, und zwar sogar vor dem Ansteigen der Gesamtaktivität des betreffenden Enzyms über den normalen Bereich oder wenn das Enzym die normale Aktivität schon wieder erreicht hat.

Damit bieten uns Isoenzymuntersuchungen die Möglichkeit einer höheren Empfindlichkeit und Spezifität in der Diagnose.
Spezifische biochemische, elektrophoretische und immunologische Eigenschaften werden allein oder kombiniert zu diesem Zweck herangezogen.

II Problemstellung

Die Enzymologie hat in den letzten Jahrzehnten eine zunehmende Bedeutung in der medizinischen Diagnostik erlangt. So haben sich viele Arbeitsgruppen das Ziel gesetzt, durch qualitativen oder quantitativen Nachweis von Enzymen oder Isoenzymen im Blutserum oder anderen Körperflüssigkeiten (Exkreten) Rückschlüsse auf das erkrankte Organ(en) ziehen zu können. In früheren Arbeiten über die alkalischen Phosphatasen wurden die Eigenschaften dieser ALP's mit Organextrakten oder mit teilweise gereinigten Präparaten (außer Placenta-ALP) bestimmt. Dabei ist noch nicht völlig gesichert, ob diese verschiedenen Eigenschaften wirklich auf die organspezifischen Isoenzyme oder auf noch vorhandene andere ALP-Enzymformen als Verunreinigungen zurückzuführen sind. Um diese Frage 100%ig zu klären, müssen die einzelnen ALP-Enzymformen aus den betreffenden Organen rein isoliert und dann charakterisiert werden. Wenn die ALP's der einzelnen Organe in ihren Eigenschaften nicht identisch sind, dann müßten sie sich entweder in ihrer Primärstruktur, Konformation oder im Nichtprotein-Anteil der Moleküle wie z.B. dem Kohlenhydrat-Anteil unterscheiden. Mit immunologischen Techniken kann man prüfen, ob diese Enzymformen gleiche, teilweise gemeinsame oder unterschiedliche immunologisch reaktive Strukturbereiche (Determinanten) besitzen. Eine immunologische Identität beweist die Gemeinsamkeit der erfaßten Determinanten und deutet auf die Identität der Tertiärstruktur hin.

Das primäre Ziel dieser Arbeit ist die Reindarstellung sowie die biochemische und immunologische Charakterisierung der Isoenzyme der alkalischen Phosphatasen aus Organen des Menschen, um damit eine neue Möglichkeit für die klinische Diagnostik aufzuzeigen.

III

E R G E B N I S S E

Teil I

- Isolierung, Reinigung und biochemische Charakterisierung der alkalischen Phosphatasen aus menschlichen und tierischen Organen.

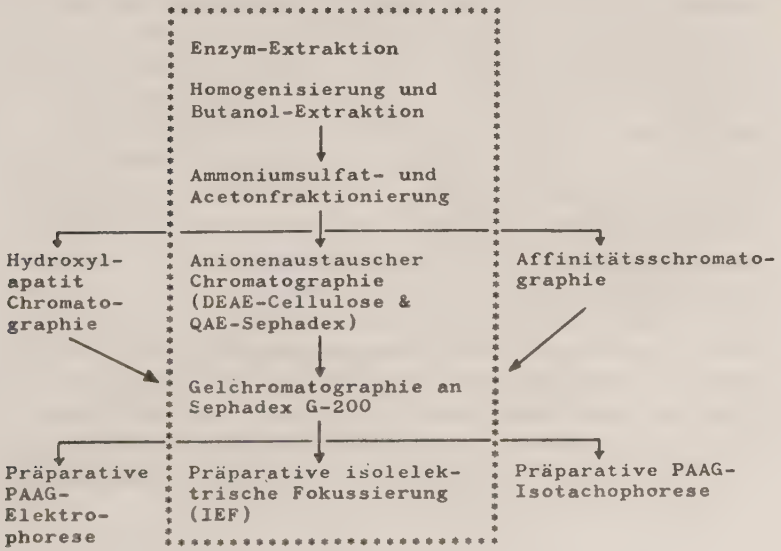
- Diskussion.

Isolierung, Reinigung und biochemische Charakterisierung der alkalischen Phosphatasen aus menschlichen und tierischen Organen:

Die bisher angewendeten Hauptmethoden zur Reinigung von Proteinen wurden im Laufe dieser Arbeit auf ihre Nützlichkeit für die Reinigung der alkalischen Phosphatase untersucht.
Folgendes Schema gibt eine Übersicht über die verschiedenen Kombinationen von Methoden, die zur Reinigung der ALP herangezogen wurden.
Die im Schema umgrenzten Reinigungsschritte wurden in dieser Arbeit verwendet.
Über die anderen Isolierungsmethoden wird am Ende dieses Kapitels berichtet. Die in dieser vorliegenden Arbeit häufig verwendeten Puffern wurden als

Puffer A bzw. Puffer B bezeichnet.

Puffer A: 0,05 M Tris/HCL, PH 8,0
Puffer B: 0,02 M Tris/HCL, PH 8,0



A. Alkalische Phosphatase aus menschlichen Organen:

A. 1. Dünndarm-ALP:

In meiner Diplom-Arbeit von 1973 [93] wurde über die Reinigung der alkalischen Phosphatase aus menschlichem Dünndarm berichtet. In der hier vorliegenden Arbeit gelang es mir jedoch, das Enzym in einer höheren spezifischen Aktivität zu gewinnen, sowie die Auftrennung in drei enzymatisch aktive Fraktionen mit folgenden isoelektrischen Punkten 4,3; 4,8; und 6,0. Jede dieser Franktionen stellt ein einheitliches Protein dar, wie durch Disk-Elektrophore isoelektrische Fokussierung im PAA-Gel und Immun-Elektrophorese festgestellt wurde.
Die Tabelle (1) und die Abbildungen 1; 2; 3 und 4 zeigen eine repräsentative Übersicht über die Reinigungsschritte der ALP aus menschlichem Dünndarm. Einzelheiten darüber sind in einer Publikation von KHATTAB und PFLEIDERER [94] sowie zum Teil in der Diplom-Arbeit beschrieben.
Im folgenden ist eine Beschreibung der verbesserten präparativen isoelektrischen Fokussierungsmethode, die in jeder Aufarbeitung zur Reinigung bzw. Auftrennung der ALP aus verschiedenen Organen als letzter Reinigungsschritt angewendet wurde, aufgeführt. Um eine lokale Denaturierung des Enzyms an den beiden Enden der Säule zu vermeiden, wurde der Saccharose-Dichte-Gradient wie folgt hergestellt:
Zunächst wurde eine dichte Anoden-Lösung bestehend aus o.3 ml konzentrierter H_3PO_4, 12 g Saccharose und 14 ml destilliertem Wasser wurden in den Anoden-Raum am unteren Ende der LKB-Säule gegeben. Die dichte Lösung, enthaltend 35 g Saccharose und 2 ml einer 40 %ige Ampholie, wurde auf 50 ml gefüllt. Die leichte Lösung besteht aus 50 ml einer 4 %igen Saccharose-Lösung. Der Gradient wurde dann in der Säule mit Hilfe eines linearen Gradientenmischers (LKB) und einer peristaltischen Pumpe in die Säule eingesetzt bzw. aufgebaut. Nachdem ungefähr 15 ml der Gradienten-Charge in der Säule durchgelaufen waren, wurde die leichte Lösung

durch ein gleiches Volumen mit der Enzymprobe in einer 4 %igen Saccharose-Lösung + 0.8 ml Ampholin ersetzt, und der Gradient nun bis zu Ende fortgesetzt.
Der noch verbliebene Raum zwischen der Gradienten-Oberfläche und der oberen Elektrode wurde mit etwa 5 ml einer 2 % igen Saccharose-Lösung + 0.1 ml Ampholine aufgefüllt.

Die "leichte Kathode Lösung" besteht aus 1 ml Diäthanolamin in 10 ml destilliertem Wasser. Diese wurde vorsichtig über die Gradienten-Oberfläche bzw. in den Kathoden-Raum gegeben.Der Fokussierungsvorgang kann nun beginnen durch Anlegung eines Potentials von ca. 500 V. Während der gesamten Fokussierungsdauer von ca. 70 Stunden wurde die Temperatur auf 4 - 6 ^{o}C gehalten. Die Stromstärke sinkt kontinuierlich von 8 mA auf ca. 0.5 mA ab. Am Ende der Fokussierung wurde der Säulen-Inhalt durch eine peristaltische Pumpe mit einer Durchflußgeschwindigkeit von etwa 2 ml/min entleert. Fraktionen von etwa 1.4 bis 2 ml wurden gesammelt und ihre pH-Werte bei der Temperatur, wie sie während der Elektrofokussierung herrschte, gemessen.
Alle Fraktionen mit einem pH-Wert unter 7 wurden sofort mit NaOH-Lösung bis zur Neutralität titriert. Zn^{2+} Ionen wurden zu jeder Fraktion (außer denjenigen mit pH-Werten unter 3) bis auf 1 mM Endkonzentration zugegeben und die einzelnen Fraktionen auf 3 ml mit Puffer A aufgefüllt. Nach 12 stündiger Inkubation in der Kälte wurden die ALP aktiven Fraktionen gegen den Puffer A + 0.02 mM Zn^{2+} dialysiert. Jede Fraktion wurde dann auf seine ALP-Aktivität getestet und jede Gruppe von ALP-Fraktionen, die einer bestimmten Form des Enzyms entsprechen, wurde vereinigt, konzentriert in einer Amicon-Zelle mit PM 30 Membrane und schließlich auf Sephadex G-25 oder G-200 chromatographiert.

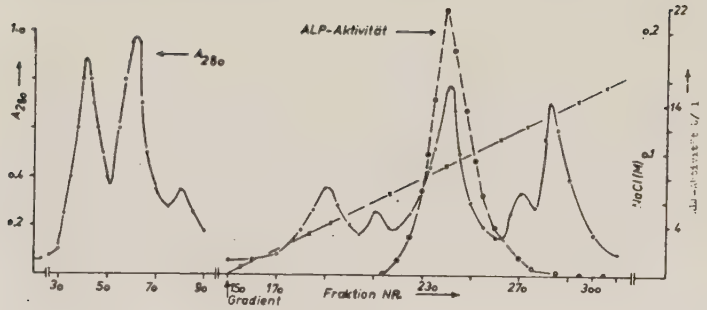
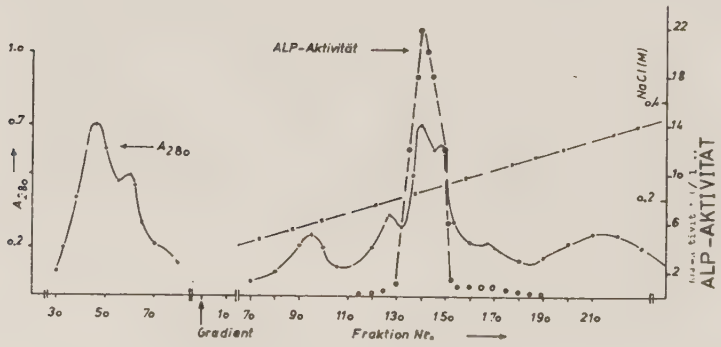


Abb. 1: Chromatographie von ALP aus menschlichem Dünndarm (Acetonfraktionierung) auf DEAE-Cellulose 52 von Whatman. Säulendimension: 35 x 5 cm
Puffer: Tris/HCl; o,o1 M; pH 7,5
Gradient: o - o,2 M NaCl (3L).
Mittleres Fraktionsvolumen: 10 ml

Abb. 2: Chromatographie von ALP aus menschlichem Dünndarm (Aceton Fraktionierung) auf QAE-Sephadex A-50.
Säulendimension: 60 x 5,5 cm
Elutionsmittel: Puffer A mit linearem NaCL-Gradienten von o-o,4 M.
Fraktionsvolumen: ca. 15 ml



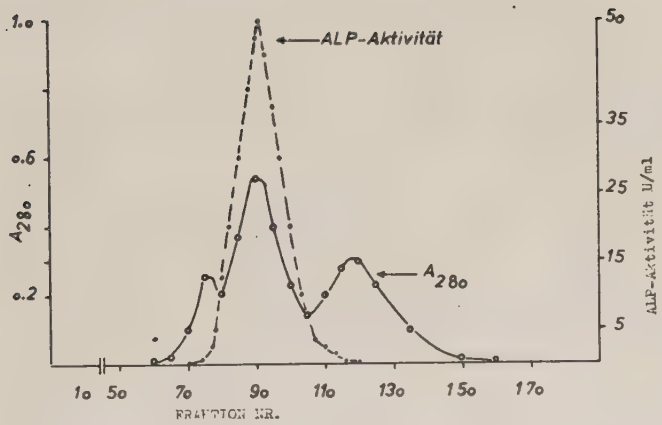


Abb. 3: Gelfiltration von ALP aus menschlichem Dünndarm an Sephadex G-200. Säulendimension: 96 x 4 cm
Puffer: Puffer A + 2 mM Mg^{2+} + o,1 M NaCl
Fraktionsvolumen: ca. 5 ml
Durchflußgeschwindigkeit: ca. 25 ml/Std

Abb. 4: Präparative isoelektrische Fokussierung von menschlichem Dünndarm-ALP (Anreicherungsstufe; Sephadex G-200)
Trägerampholin: 2%ig; pH-Bereich 3,5 - 7.
———o——— Absorption bei 280_{nm}.
---------- ALP-Aktivität
..... pH-Gradient.

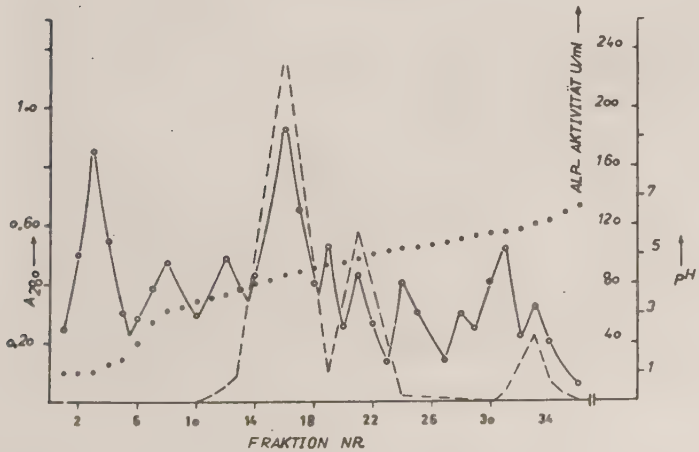


Tabelle (1)

Reinigungsschema der alkalischen Phosphatase aus menschlichem Dünndarm

Reinigungsschritt	Gesamt Aktivitäten (U)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Reinigungs-faktor (n-fach)
Butanol-Extrakt	7810	9524.4	0.82	100	1
Ammoniumsulfat-fraktionierung	6638	1580	4.20	85	5
Acetonfraktionierung	5936	371	16.00	76	19.5
QAE-Sephadex A-50 Chromatographie	4670	74	63.00	59.80	77.0
Sephadex G-200 Chromatographie	4402	31	142.00	56.30	173.0
Präparative isoelektrische Fokussierung					
Fraktion I*	1762	7.5	235.00	22.60	286.0
Fraktion II**	448	2.8	160.00	5.70	195.0
Fraktion III***	76	1.0	76.00	0.90	92.00

* Isoelektrische Punkte = 4.3
** " " = 4.8
*** " " = 6.0

A.2 Alkalische Phosphatase aus menschlicher Leber:

Die Gewinnung einer gereinigten alkalischen Phosphatase aus der Leber erfolgte grundsätzlich entsprechend der ausführlich beschriebenen Methode zur Reinigung der Dünndarm-ALP.

Im Folgenden ist eine kurze Beschreibung der Reinigungsschritte mit Betonung auf bestimmte Abwandlungen der Original Methode angegeben:

1) Normale menschliche Leber wurde bei der Autopsie innerhalb 24 Stunden nach dem Ableben abgeholt und sofort bearbeitet.
2) Homogenisierung und Extraktion:
   Die Leber wurden aus ihren Kapseln befreit, in kleine Stücke geschnitten und solange mit kaltem Wasser gespült, bis der Überstand relativ frei von Erythrocyten war. Das Material wurde dann in kaltem Puffer A und n-Butanol im Verhältnis 100 g/400 ml Puffer + 100 ml Butanol 1 Min. lang hochtourig in einem Sorval Omnimix homogenisiert und weiter, wie bei Dünndarm-ALP im Extraktionsschritt beschrieben, aufgearbeitet.
3) Acetonfraktionierung:
   Anders als bei der Reinigung der Dünndarm-ALP, wurde der Butanol-Extrakt sofort einer Acetonfraktionierung unterworfen. Dabei wurde die Fraktion zwischen 30-60 %ig Sättigung (v/v) an Aceton gesammelt und in Puffer A gelöst.
4) Ammoniumsulfatfraktionierung:
   Das zwischen 40 und 70 %ige Sättigung an $(NH_4)_2SO_4$ erhaltene Präzipitat wurde in Puffer A aufgenommen, gegen denselben Puffer +o.o2 mM Zn^{2+} dialysiert und anschließend konzentriert.
5) QAE-Sephadex Chromatographie:
   Die QAE-Sephadex A-50 Säule (75 x 5 cm) wurde mit Puffer A äquilibriert. Nach dem Auftragen der Enzymlösung wurde die Säule mit dem Äquilibrierungs-Puffer gewaschen, dann mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0.4 M an NaCl in 4 L Volumen eluiert. Fraktionen

der höchsten Aktivität wurden vereinigt, konzentriert und dann extensiv gegen Puffer B dialysiert. Das Elutionsdiagram ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

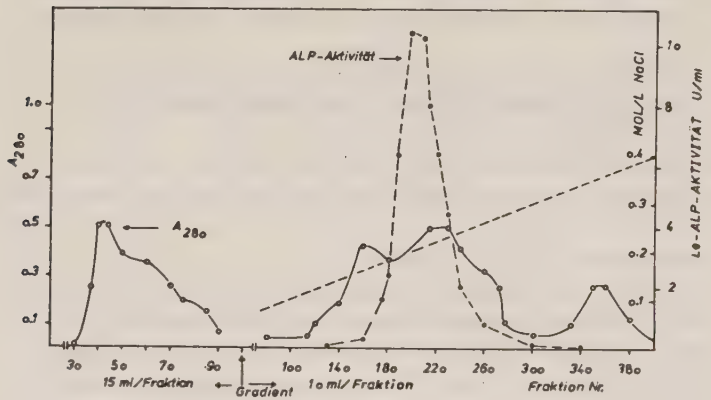


Abb. 5: Anionenaustauscher Chromatographie der ALP aus menschlicher Leber (Anreicherungsstufe 3) an QAE-Sephadex A-50.

Säule: 75 x 5,5 cm
Puffer: Puffer A
Linearer Gradient: o - o,4 M NaCl
Fraktionsvolumen: ca. 10 ml
---------- : NaCl Gradient.

6) DEAE-Cellulose Chromatographie:

Auf eine Säule (40 x 5 cm), die mit Puffer B äquilibriert war, wurde nach dem Auftragen des Enzyms ein linearer Gradient von 0 bis 0.2 M an NaCl mit 1.5 L Puffer in jedem Gefäß eingesetzt. Die hochaktiven Fraktionen wurden vereinigt und bis auf ca. 30 mg/ml konzentriert. Abbildung 6.

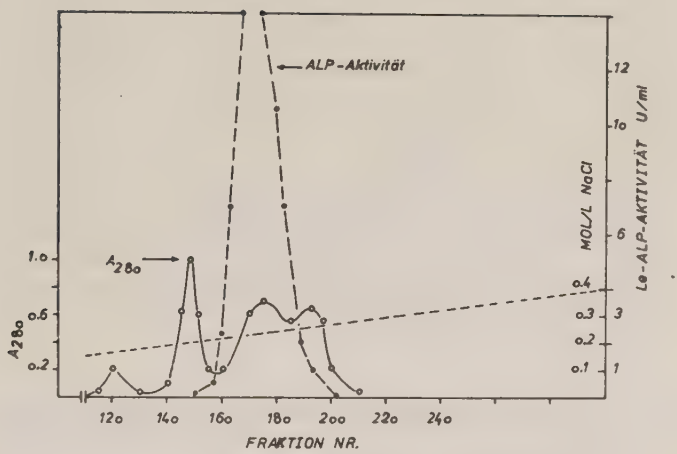


Abb. 6: DEAE-Cellulose Chromatographie der durch QAE-Sephadex vorgereinigten Leber-ALP.
Elutionsmittel: Puffer B mit linearem NaCl-Gradienten von o-o,2 M NaCl in 3 L Puffer.
Säulendimension: 40 x 5 cm
Mittleres Fraktionsvolumen: 10 ml
----------: NaCl Gradient.

7) Gelchromatrgraphie an Sephadex G-200:
Die konzentrierte Enzymlösung wukde dann durch Gelfiltration an einer mit Sephadex G-200 gefüllten Säule, die mit Puffer A äquilibriert + 0.1 M NaCl + 0.02 mM Zn^{2+} war, weiter gereinigt.
Ca. 80 % der aufgetragenen Aktivität wurde zurückgewonnen. In der PAAG-Disc-Elektrophorese zeigte dieses Präparates 4 enzymatisch aktive Banden. Siehe Elutionsdiagram in Abbildung 7 und Abb. 8.

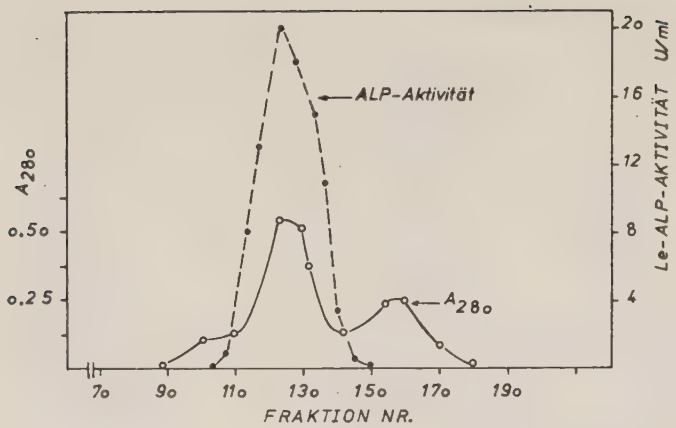
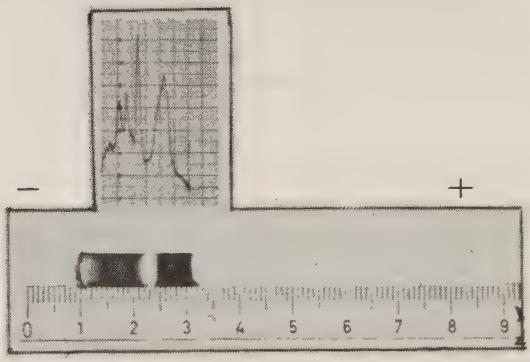


Abb. 7: Säulen-Chromatographie von ALP aus menschlicher Leber (Anreicherungsstufe 4) über Sephadex (-200.

Säulendimension: 125 x 4,6 cm
Puffer: Puffer A + 0,02 mM Zn^{2+} + 0,1 M NaCl.
Mittleres Fraktionsvolumen: 8 ml
Durchflußgeschwindigkeit: ca. 20 ml/Std.

Abb. 8: Polyacrylamid gel-Disk-Elektrophorese der Leber-ALP (Butanol-Extrakt).
Trenngel: 7,5 %, Tris/Glycin-Puffer pH 8,3;
4 mA pro Röhrchen; Laufzeit ca.
120 Min. bei 5°C.
enzymspezifische Färbung



8) Isoelektrische Fokussierung:

Das hochgereinigte Leber-ALP Präparat wurde weiter durch isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten von 3.5 - 7 zu 4 enzymatisch aktiven Fraktionen aufgetrennt.

Die relativen Anteile dieser Enzym-Formen waren:

48 : 33 : 11 : 8 mit entsprechenden PI von:

3,9; 4,2; 4,9 & 5. 3.

Fraktion II, die als reines Protein auf isoliert wurde, wurde zur Immunisierung verwendet.

Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Auftrennungsdiagramm.

Abbildung 10 dokumentiert die Reinheit der Leberphosphatase - II.

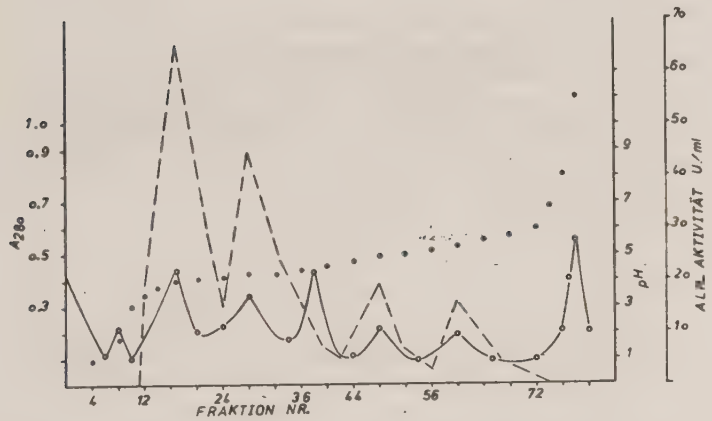


Abb. 9: Präparative isoelektrische Fokussierung von ALP aus menschlicher Leber der Anreicherungsstufe (Sephadex G-200)

Trägerampholin: pH-Bereich 3,5 - 7; 2 %ig im linearen Saccharose Dichte-Gradienten.

———o——— Absorption bei 280 nm.

---------- ALP-Aktivität

..... pH-Gradient.

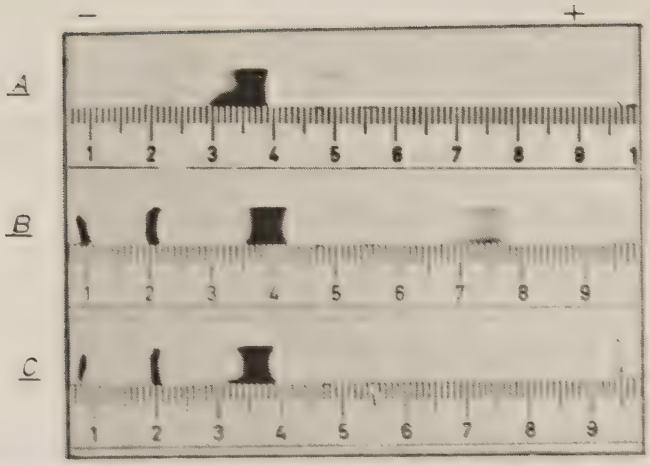


Abb. 10: PAAG disk-Elektrophorese der durch IEF gereinigten ALP aus menschlicher Leber, Fraktion II.
Trenngel 7,5 %; Tris/Glycin-Puffer pH 8,3; 4 mA pro Röhrchen; Laufzeit ca. 120 Min. bei 5°C.

A : Enzymspezifische Färbung

B : Proteinfärbung (Präparat vor der Rechromatographie an Sephadex G - 200).

C : Proteinfärbung (dasselbe Präparat nach Rechromatographie an Sephadex G-200)

Tabelle 2

Übersicht über die Anreicherung der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Leber

Reinigungsschritt	Gesamt Aktivität (U)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungs-faktor (n-fach)	Ausbeute (%)
Butanol-Extrakt	4732	6760	0.7	1	100
Acetonfraktionierung	4025	1916,7	2.1	3	85
Ammoniumsulfatfraktionierung	3621	517,3	7.0	10	76,5
QAE-Sephadex A-50 Chromatographie	3440	215	16	22,9	72,7
DEAE-Cellulose Chromatographie	3160	75,2	42	60	66,8
Sephadex G-200 Gel-Chromatographie	2462	32,8	75	107,1	52
Präparative isoelektrische Fokussierung					
Fraktion I	710	7.1	100	142,9	15
Fraktion II	500	4	125	178,6	10,6
Fraktion III	180	1,9	95	135,7	3.8
Fraktion IV	125	1.9	65	92,9	2,6

A. 2. Alkalische Phosphatase aus Placenta.

Reinigungsmethode:

Die menschliche Placenten wurden so frisch wie möglich von der Entbindungsstation abgeholt und sofort (denn es empfiehlt sich die Organe nicht einzufrieren) wie folgend aufgearbeitet; nach der Entfernung der Nabelschnur und der Membranen wurde die Placenta mit kaltem Wasser gespült. Die beste Methode um die Placenta vom Blut zu befreien, geschieht durch Spühlung mit einem Wasserstrahl; anschließend durch Perfundierung mit einer o.25 M Saccharose-Lösung mit Heparin, und durch die Entfernung der Blutgefäße. Die so präparierte Placenta kann nun bei -20°C aufbewahrt oder weiter aufgearbeitet werden.

1) Homogenisierung und Extraktion:

Die gründlich gereinigte Placenta wurde kleingeschnitten, gewogen und in Puffer A (5 ml/g) mit einem Starmix hochtourig 2 Minuten lang homogenisiert. Kaltes n-Butanol wurde nun langsam unter starkem mechanischem Rühren zu dem Homogenat gegeben, bis eine creamfarbige Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde dann auf 37°C für 1 h inkubiert, dann unter mäßigem Rühren bei 4°C über Nacht stehengelassen. Die Emulsion wurde wieder auf 37°C für 30 Min. inkubiert. Dieser Vorgang war wichtig, denn dadurch wurden die kolloiden Partikeln kodguliert und ließen sich leichter durch Zentrifugation sedimintieren. Nach Zentrifugation (18 000 x g; 30 Min.) wurde die Emulsion in vier Schichten aufgetrennt: ein schweres Sodiment, eine gelbliche wäßrige Phase, darüber eine leichte Partikelschicht und schließlich die Butanol-Schicht. Der Überstand wurde durch Glaswolle filtriert, nochmals abzentrifugiert, filtriert und schließlich die wäßrige Phase von der Butanol-Schicht mit Hilfe eines Scheidetrichters abgetrennt. Das Sediment aus der ersten Zentrifugation wurde noch zweimal mit Butanol extrahiert. Die wäßrigen Phasen aus allen drei Extraktionen wurden

schließlich vereinigt.

2) Ammoniumsulfatfraktionierung:
Zu der klaren und kalten Enzymlösung wurde feingepulvertes $(NH_4)_2SO_4$ bis zu 40 %iger Sättigung zugegeben. Nach Abzentrifugation wurde im Überstand die Ammoniumsulfat-Konzentration weiter auf 65 % erhöht und die Suspension über Nacht stehengelassen. Das leichte Präzipitat, das an die Oberfläche stieg, erleichtert den Zentrifugationsprozess dadurch, daß der größte Teil der wäßrigen Schicht vorher durch Absaugen entfernt werden konnte. Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment wurde dann in Puffer B gelöst und die unlöslichen Partikeln verworfen. Die Enzymlösung wurde schließlich gegen Puffer B dialysiert.

3) Acetonfraktionierung:
Die dialysierte Enzymlösung wurde auf etwa $0^{o}C$ abgekühlt und stark abgekühlte Aceton p.A. (Eiskochsalzgemisch) vorsichtig und unter mäßigem Rühren bis zu 35 %ig (v/v) versetzt. Dabei soll die Temperatur in der Lösung unter $-5^{o}C$ gehalten werden. Nach 1 h Stehen bei $-5^{o}C$ wurde die Suspension abzentrifugiert (18 000 x g; 30 Min) und das Sediment entfernt. Der Überstand wurde wie vorher mit weiterem abgekühlten Aceton bis zu 60 %iger (v/v) Sättigung versetzt. Der Protein-Niederschlag wurde abzentrifugiert und das Sediment in Puffer aufgenommen, dabei das Unlösliche Sediment entfernt. Wenn der nachfolgende Reinigungsschritt durch DEAE-Cellulose Chromatographie erfolgt, wurde der zweite Aceton-Niederschlag in Puffer B gelöst. Jedoch bei einer QAE Sephadex Chromatographie wurde dieses Präzipitat in Puffer A gelöst. In beiden Fällen wurde gegen den jeweiligen Puffer dialysiert und der durch Dialyse eventuell entstehenden geringe Niederschlag abzentrifugiert.

4) QAE Sephadex A-50 Chromatographie:
Die Enzymlösung aus dem Acetonfraktionierungsschritt wurde auf eine QAE Sephadex Säule (70 x 5 cm), die mit Puffer A äquilibriert war, aufgetragen. Nach dem die nicht adsorbierten Proteine ausgewaschen waren, wurden

die adsorbierten Proteine durch einen linearen Gradienten von 0-0,4 M NaCl in einem Gesamtvolumen von 4 L an Puffer A + o,o2 mM Zn^{2+} eluiert. Die enzymatisch hoch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert. Abb. 11

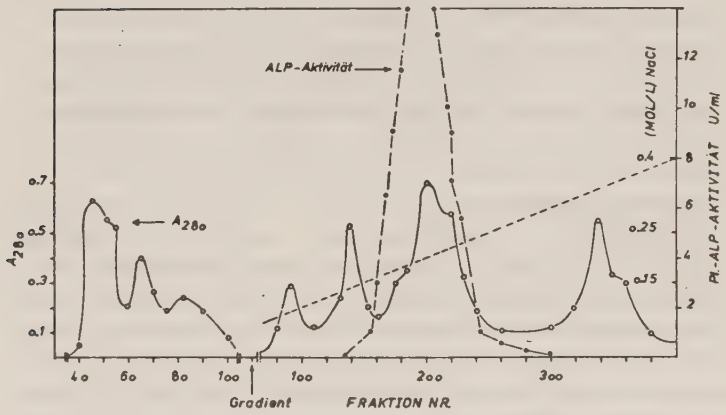


Abb. 11: Chromatographie von ALP aus menschlichem Placenta auf QAE-Sephadex A-50.
Säule: 70 x 5,5 cm
Puffer: Puffer A; Gradient: o - o,4 M NaCl in 4 L Puffer
Fraktionsvolumen: ca 10 ml
---------: NaCl Gradient.

5) DEAE-Cellulose Chromatographie:

Die aus der QAE Sephadex Reinigungsschritt erhaltene Enzymlösung wurde gegen Puffer B extensiv dialysiert und auf eine mit demselben Puffer äquilibrierten DEAE-Cellulose Säule aufgegeben., anschließend wurde mit zwei Sälevolumen Puffer B gespült. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen

Salzgradienten von 0 bis 0.4 M NaCl in Puffer B. Die hochaktive Fraktionen wurden gesammelt und konzentriert. Abb. 12

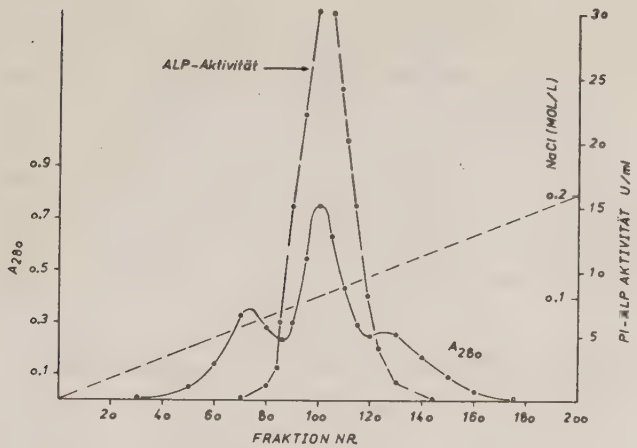


Abb. 12: Rechromatographie von Placenta-ALP auf DEAE-Cellulose -52 von Whatman.
Säule: 35 x 4 cm
Puffer: Puffer B; Gradient: o - o,2 M NaCl in 2 L Puffer
Mittleres Fraktionsvolumen: 10 ml
----------: NaCl Gradient.

6) Sephadex G-200 Gel Chromatographie:

Die konzentrierte Enzymlösung von dem vorherigen Schritt wurde durch eine Sephadex G-200 Säule (115 x 4,5 cm) die mit Puffer B äquilibriert war, chromatographiert. Die ALP aktiven Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert.

Abb. 13 zeigt das Elutionsdiagramm eines Säulenlaufs mit einem einzigen Aktivitätsgipfel.

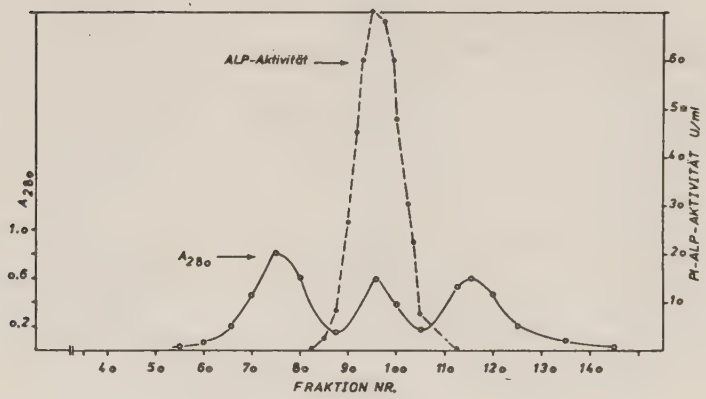


Abb. 13: Chromatographie von Placenta-ALP auf Sephadex G-200.
Säule: 115 x 4,5 cm
Puffer: Puffer A + o,o2 mM Zn^{2+} + o,1 M NaCl.
Fraktionsvolumen: ca 10 ml
Mittlere Durchflußgeschwindigkeit: 20 ml/Std.

Präparative isoelektrische Fokussierung:
Das Enzym-Präparat aus dem Sephadex G-200 Reinigungsschritt wurde gegen 1 %ige Glycin-Lösung dialysiert, wenn nicht durch andere Methoden die Ionen-Konzentration in der Lösung unter o,o5 mM gehalten werden könnte. Der Fokussierungsvorgang wurde wie er bei der Aufarbeitung der Darm-Phosphatase beschrieben, durchgeführt. Wie Abb. 14 zeigt, wurde die enzymatische Aktivität in zwei Hauptfraktionen aufgetrennt; die eine hat einen pI-Wert

von 4.4, die andere von 5.35.
Fraktion I mit pI 4.4 zeigte nur eine einzige Protein-Bande, während die andere noch Spuren von fremdem Proteine enthält, welche durch einen chromatographischen Schritt auf DEAE-Cellulose völlig entfernt werden konnte. Abb. 15 zeigt völlige Reinheit in der Disc-Elektrophorese.

Die Placenta-ALP (Fraktion I), sowie das Enzym aus der Sephadex G-200 Reinigungsschritt wurden zur Erzeugung von Antiseren im Kaninchen verwendet.

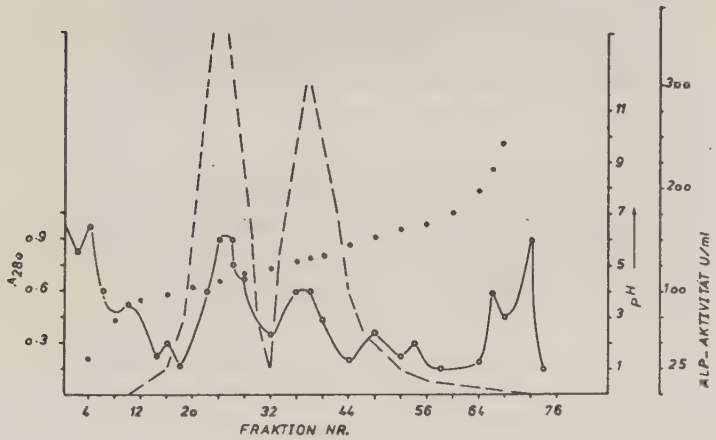


Abb. 14: Präparative isoelektrische Fokussierung von ALP aus menschlicher Placenta.
Ein 50fach gereinigtes Enzympräparat enthaltend ca. 32 mg Protein wurde in einer LKB 110 ml Säule bei 5°C im Saccharose-Dichte-Gradienten mit Trägerampholin pH-Bereich 3,5 - 7 (2 %ig) fokussiert.

———o———Absorption bei 280 nm

---------- ALP-Aktivität

..... pH-Gradient

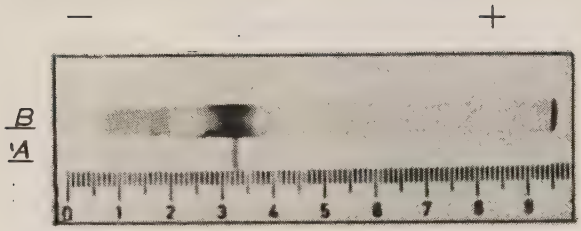


Abb. 15: Polyacrylamid Gel disc-Elektrophorese von gereinigter ALP aus menschlicher Placenta, Fraktion II nach IEF. Trenngel 8 %; Tris/Gly Puffer pH 8,3; 4mA pro Röhrchen; Laufzeit: 100 Min bei 5°C.
A: Protein-spezifische Färbung
B: Enzym-spezifische Färbung.

Tabelle 3

Reinigungsschema der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Placenta

Reinigungsschritt	Gesamt Aktivität (U)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungs-faktor (n-fach)	Ausbeute (%)
Butanol-Extrakt	13415	6700	2	1	100
Ammoniumsulfat-fraktionierung	12068	1508,5	8	4	90
Acetonfraktionierung	10258	789	13	6,5	76,7
QAE-Sephadex A-50 Chromatographie	8720	254	34,3	17,2	65
DEAE-Cellulose Chromatographie	7842	142	55,2	27,6	58,5
Gel-Chromatographie an Sephadex G-200	7058	31,6	223	111,5	52,6
Präparative isoelektrische Fokussierung					
Fraktion I	2950	10	295	147,5	22
Fraktion II	2820	7,8	361,5	180,8	21

A.4: Nieren ALP

Reinigungsmethode:

1) Organe: Nieren aus normalen Individuen wurden innerhalb von 24 h nach dem Tod bei Autopsien entnommen.
   Die Nieren wurden aus ihren Membran-Kapseln befreit und der Länge nach aufgeschnitten, Fett- und das meiste Nierenmark-Gewebe wurden entfernt. Das Material wurde dann klein geschnitten und mit kaltem Wasser gewaschen.
2) Homogenisierung und Extraktion:
   Das Nierenmaterial wurde dann homogenisiert und mit n-Butanol extrahiert, wie bei der Dünndarm-ALP Isolierung beschrieben wurde.
3) Ammoniumsulfatfraktionierung
   Zu dem rötlich gefärbten Butanol-Extrakt wurde Ammoniumsulfat in zwei Portionen zugegeben um eine Endkonzentration von 35 % bzw. 65 % Sättigung zu erreichen. Das Präzipitat aus dem Sättigungsbereich (35 - 65 %) wurde in Puffer B + o.o2mM Zn^{2+} gelöst und gegen denselben Puffer dialysiert.
4) Acetonfraktionierung:
   Auf die abgekühlte Enzym-Lösung wurde langsam ein tiefgekühltes Aceton unter Rühren bis zu 35 %iger (v/v) Endkonzentration zugegeben. Die Suspension wurde dann bei -5°C für drei Stunden stehengelassen, danach abzentrifugiert und das Präzipitat verworfen. Der Überstand wurde dann durch weitere Zugabe an tief gekühltem Aceton auf 55 % Endkonzentration (v/v) erhöht und anschließend abzentrifugiert. Der Sediment wurde in Puffer B gelöst. Nach Entfernung der ungelösten Partikel wurde die Enzymlösung ausgiebig gegen Puffer B dialysiert.
5) Anionenaustauscherchromatographie:
   A) DEAE-Cellulose Chromatographie: Die Enzymlösung aus dem Acetonreinigungsschritt wurde auf eine DEAE-Cellulose Säule (45 x 5,5 cm), die vorher mit Puffer B äquilibriert war, aufgetragen. Die adsorbierten Proteine wurden entweder durch einen linearen Gradienten von 0 bis 0,2 M NaCl

in einem Gesamtvolumen von 3 L an Puffer B eluiert. Die ALP-aktiven Fraktionen wurden zusammen gepoolt, ausgiebig gegen Puffer A dialysiert und anschließend konzentriert.

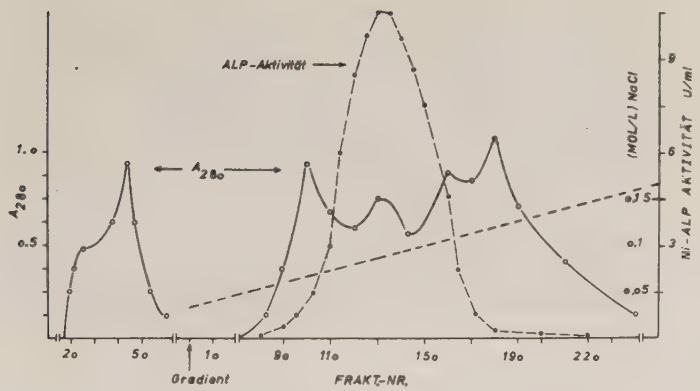


Abb. 16: Anionenaustauscher Chromatographie der ALP aus menschlicher Niere an DEAE-Cellulose -52.
Säule: 45 x 5,o cm
Puffer: Puffer B
Gradient: o - o,2 M NaCl
Mittleres Fraktionsvolumen: 10 ml

B) Rechromatographie an QAE Sephadex:
Die dialysierte Enzymlögung aus dem vorherigen Schritt wurde auf eine QAE Sephadex A-50 Säule (50 x 5 cm), die durch Puffer A äquilibriert war, aufgetragen. Das Enzym wurde dann durch einen linearen Gradienten von 0 bis 0,4 M NaCl in 1 L Puffer A eluiert. Die Fraktionen mit mindestens 1/4 der Aktivität in der höchstaktiven Fraktion wurden vereinigt und konzentriert. Abbildung 17 zeigt das Elutionsdiagramm.

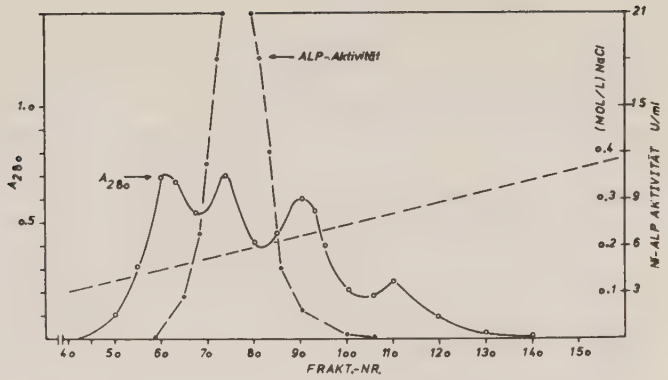


Abb. 17: QAE Sephadex A-50 Chromatographie einer durch DEAE-Cellulose Chromatographie gereinigte Nieren-ALP Präparat. Elutionsmittel: Puffer A mit linearem NaCl-Gradienten von o - o,4 M NaCl in 2 L Puffer.

Säule: 50 x 5 cm

Mittleres Fraktionsvolumen: 12 ml

Abbildung 18 zeigt eine PAAG Disc-Elektrophorese für verschiedene Fraktionen der Gradienten-Elution der Nieren-Phosphatase. Dabei zeigt sich, daß Enzym aus ALP-Proteinmolekülen mit einer graduellen Zunahme an negative Ladung besteht.

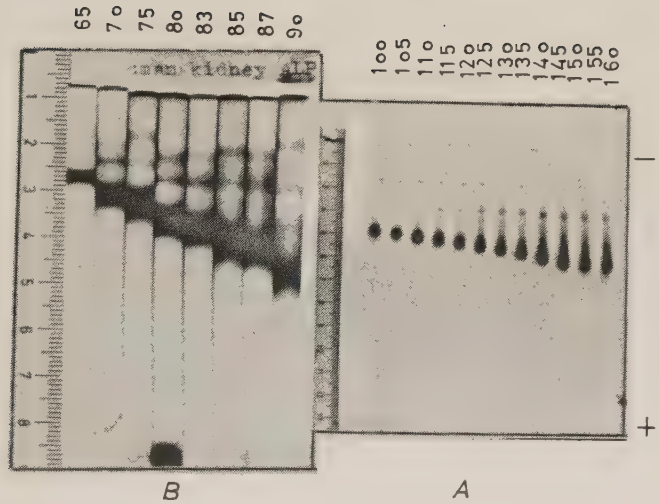


Abb. 18: A: PAAG-Flachdisk-Elektrophorese von ALP aus menschlicher Niere in verschiedenen Fraktionen aus der DEAE-Cellulose Chromatographie.
Puffer: Tris/Borat pH 9.o.
Trenngel 7,5 %
Laufzeit: ca. 120 Min. bei 5°C.

B: PAAG-disk-Elektrophorese von ALP aus menschlicher Niere in verschiedenen Fraktionen aus der QAE-Sephadex Chromatographie
Elektrophorese Bedingungen: wie A

6) Gel Chromatographie:

Das angereicherte Enzym-Präparat wurde dann durch Sephadex G-200 gereinigt. Der Äquilibrierungs-Puffer enthielt o,1 M NaCl + o,o2 mM Zn^{2+}.

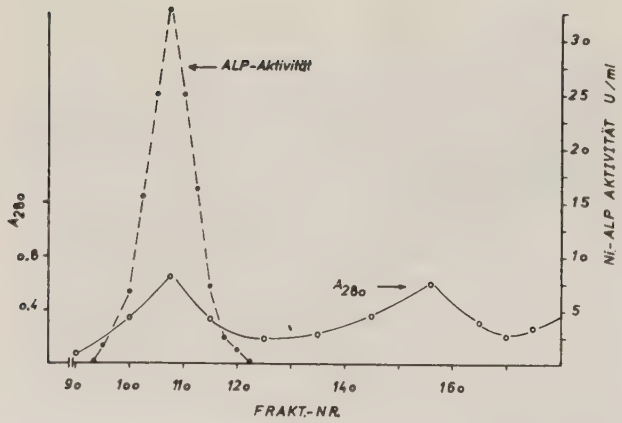


Abb. 19: Chromatographie von ALP aus menschlicher Niere der Anreicherungsstufe 5 durch Gelfiltration über Sephadex G-200.

Puffer: Puffer A + o,1 M NaCl + 9o2 mM Zn^{2+}

Fraktionsvolumen: ca. 10 ml

Säule: 127 x 4,6 cm.

Mittlere Durchflußgeschwindigkeit: 18 ml/Std.

7) Präparative isoelektrische Fokussierung:

Das hoch gereinigte Enzym-Präparat aus dem Gel-Filtrationsschritt wurde durch Fokussierung im Saccharose Dichte-Gradienten (wie unter A.1 beschrieben wurde) in drei Aktivitätsgipfel aufgetrennt. Die Aktivitätsverhältnisse in den drei Fraktionen unterschieden sich jedoch von einer Aufarbeitung zu einer anderen um ± 10 %. Jeder der drei enzymatisch aktiven Fraktionen wurde anschließend durch Sephadex G-200 chromatographiert. Diese Enzym-Fraktionen waren einheitlich wie es durch PAAG-disc-Elektrophorese gezeigt werden konnte. Abb. 21.

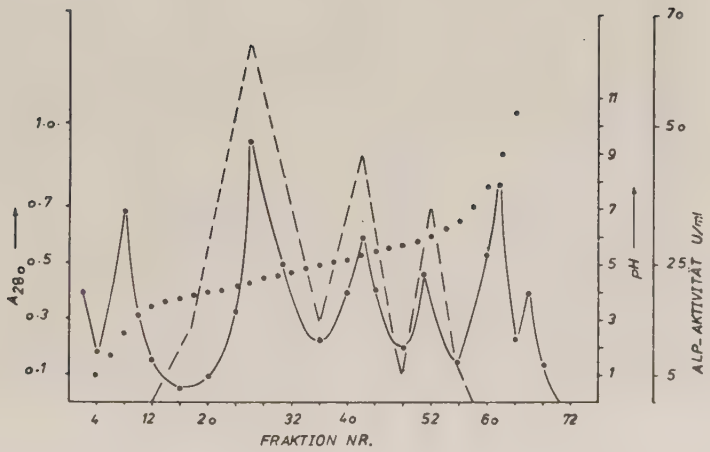


Abb. 20: Präparative isoelektrische Fokussierung im Saccharose dichte-Gradienten von ALP aus menschlicher Niere (nach Sephadex G-200 Reinigungsschritt.

Trägerampholin: 2 %ig; pH-Bereich 3,5 - 7

———o——— Absorption bei 280 nm

- - - - - - - - - - - - - - ALP-Aktivität

. . . . . pH - Gradient.

Tabelle 4:

Reinigungsschema der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Niere

Reinigungsschritt		Gesamt Aktivität (U)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungsfaktor (n-fach)	Ausbeute %
Butanol-Extrakt		6670	4764	1,4	1	100
Ammoniumsulfat Fraktionierung		5332	1403,2	3,8	2,7	80
Acetonfraktionierung		4850	441	11,00	7,86	72,7
DEAE-Cellulose Chromatographie		4281	170	25,2	18,00	64,2
QAE Sephadex Chromatographie		3812	90,8	42,oo	30,00	57,2
Sephadex G-200 Gel-Filtration.		3280	33,8	97,00	69,3	49,2
Präparative isoelektrische Fokussierung und Sephadex						
G-200 Chromatographie	Fraktion I	1200	8	150	107	18
	Fraktion II	905	5	181	129,3	13,6
	Fraktion III	400	3,2	125	89,3	6,0

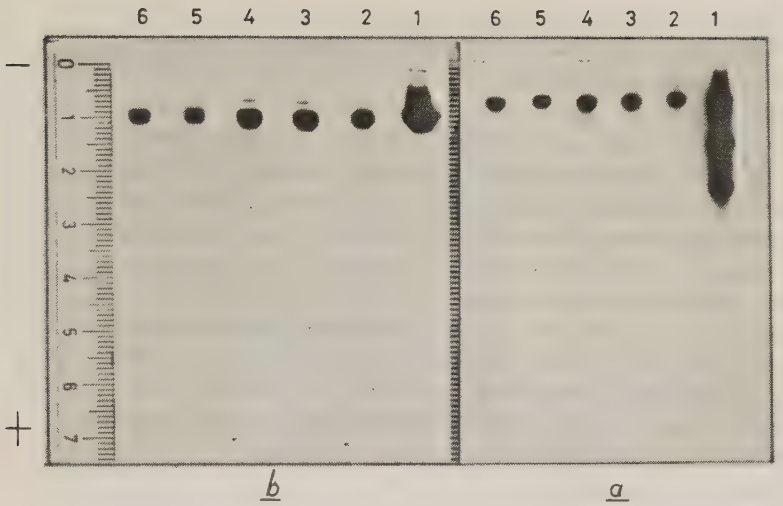


Abb. 21: PAAG disk-Elektrophorese von gereinigter ALP aus menschlicher Niere.
Puffer: Tris/Gly; pH 8,3
Trenngel: 8 %ig;
Laufzeit ca. 90 Min. bei 5°C.
a) Protein-Färbung
b) Enzymspezifische Färbung
1: Ni-ALP nach DEAE-Cellulose Chromatographie
2 - 4 Ni-ALP Fraktion II nach IEF.
5 & 6 Ni-ALP Fraktion II nach IEF und Rechromatographie an Sephadex G-200.
- Das Konzentrationsgel wurde entfernt vor Dokumentation. -

A.5 Alkalische Phosphatase aus menschlichen Knochen.

Anreicherungsmethode:

1) Brustknochen wurden ausschließlich von jungen Menschen (unter 10 Jahren) als Ausgangsmaterial verwendet. Die Knochen wurden vom Fleisch befreit und mit kaltem Wasser gewaschen. Danach wurden sie zu kleinen Stücken zerkleinert, wobei das Knochenmark entfernt werden konnte.
2) Homogenisierung und Extraktion: Das zerschlagene Knochen-

material wurde in einem Fleischwolf zermahlen, anschließend im Sorvall-Omnimixer unter Kühlung mit Puffer A hochtourig homogenisiert.
Das Homogenat wurde dann mit n-Butanol unter Kühlung kurz mit einem Küchenmixer vermischt und das ganze Homogenat in einem passenden Gefäß in einer 5°C-Kühlzelle eine Woche lang mechanisch gerührt, anschließend abzentrifugiert (20 000 x g; 40 Min.) Das feinkörnige Sediment wurde einer zweiten Extraktion unterworfen. Der trübe Überstand enthielt noch feine Partikeln, die durch Filtration über einen Linnenstoff zum größten Teil entfernt werden konnten. Die Überstände aus den zwei Extraktionen wurden vereinigt und nochmals abzentrifugiert. Die noch bleibende Butanol-Schicht wurde mit Hilfe eines Scheidetrichters entfernt.

3) Acetonfraktionierung:
Dieser Reinigungsschritt wurde wie unter A.1 beschrieben durchgeführt und das Präzipitat zwischen 30 und 60 % Sättigung in Puffer B gelöst. Die Enzymlösung wurde dann konzentriert und gegen Puffer B dialysiert.

4) DEAE-Cellulose Chromatographie:
Die aus der Acetonfraktionierung gewonnene ALP wurde durch Chromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule (40 x 5 cm), die mit Puffer B äquilibriert war, angereichert. Die hoch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert.
Dieses Präparat genügte zunächst einmal, um vorläufige Untersuchungen biochemischer und immunologischer Art durchzuführen.

Reinigungsschritt	Gesamt Aktivität (U)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungs-faktor (n-fach)	Ausbeute (%)
Butanol-Extrakt	1240	7750	0,16	1,oo	100
Acetonfraktionierung	1140	950,7	1,20	7,50	92
DEAE-Cellulose Chromatographie	915	41,5	22,00	18,30	80

Tabelle 6: Anreicherung der alkalischen Phosphatase aus menschlichem Knochen:

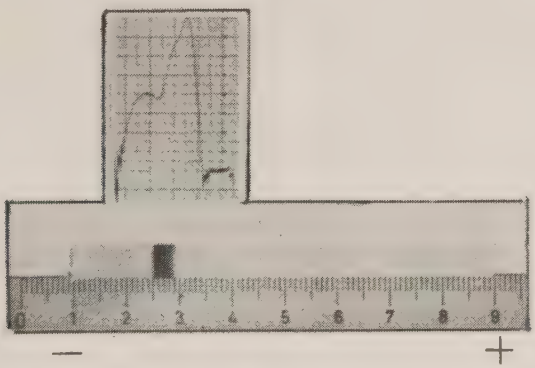


Abbildung 22 zeigt eine PAAG disc-Elektrophoretische Auftrennung der Knochen-ALP.

A.6: Anreicherung der alkalischen Phosphatase aus einigen übrigen menschlichen Organen:

Alkalische Phosphatase aus folgenden nicht pathologisch veränderten Organen wurden angereichert:

Gehirn, Pankreas, Herz, Milz, Magen.

Alle Organe wurden, wie vorher beschrieben, homogenisiert, mit n-Butanol extrahiert, mit Ammoniumsulfat sowie mit Aceton fraktioniert und anschließend über einen Anionenaustauscher chromatographiert.
Präparate dieser Anreicherungsstufe genügte für die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit notwendig waren.

B: Isolierung der alkalischen Phosphatase aus tierischen Organen:

B.1. Kälber Dünndarm-ALP:

1) Herstellung des Rohextraktes:
Kälber-Dünndärme wurden aus dem Schlachthof so schnell wie möglich (normalerweise innerhalb zwei Stunden) nach Abschlachten der Tiere abgeholt und sofort aufgearbeitet. Nach Entfernung der Mesenterien- und Fettgewebe wurden die Därme durch einen kräftigen Wasserstrahl sauber gewaschen. Die Mucosa läßt sich durch Abstreifen mit der stumphen Seite eines Messers leicht gewinnen. Die Mucosa wurde auf Q°C abgekühlt und mit Puffer A in Verhältnis 5 ml/g in einer Sorvall-Omnimixer ca. 2 Min. lang bei höchster Tourenzahl homogenisiert. Die Extrahierung mit n-Butanol wurde wie unter A. durchgeführt.
2) Ammoniumsulfat und Aceton-fraktionierung:
Der Butanol-Extrakt wurde mit 30 - 70 %ige Sättigung an Ammoniumsulfat fraktioniert. Diese Fraktion wurde weiter durch Acetonfraktionierung (35-60 %) (v/v) angereichert.
Weitere Einzelheiten siehe unter A.1.
3) Chromatographie an QAE Sephadex: Die im Puffer A gelöste und dialysierte Enzymlösung aus dem Aceton Reinigungsschritt wurde auf eine QAE Sephadex A-50 Säule (75 x 6 cm) aufgetragen.
Nach dem Auswaschen der nicht adsorbierten Proteine wurde die alkalische Phosphatase durch einen Kochsalz Gradienten, in dem die Konzentration an NaCl im Puffer A linear von 0-0,4 M zunimmt, eluiert.
Die ALP-Aktivität wurde als einen einzigen Aktivitätsgipfel eluiert. Nur der zentrale Teil des Aktivitätsgipfels mit 80 - 85 % der gesamten eluierten ALP-Aktivität wurde gesammelt. Der andere Teil der Aktivi-

tät wurde für spätere Aufarbeitungen aufbewahrt. Abb. 23 zeigt ein repräsentatives Elutionsdiagram dieses Reinigungsschrittes.

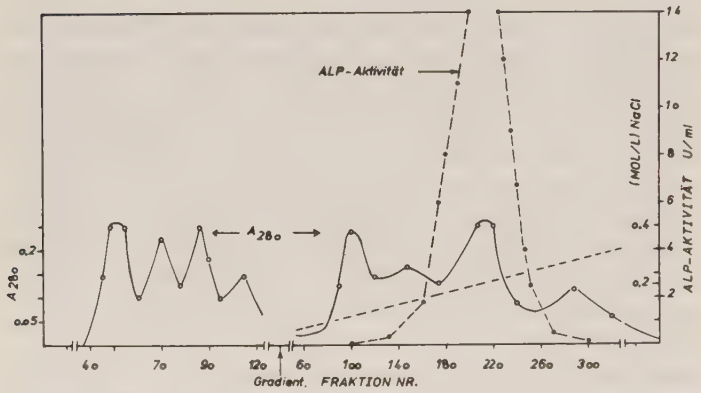


Abb. 23: Ionenaustauscher Chromatographie der ALP aus Kälber-Dünndarm über QAE Sephadex A-50.

Elutionsmittel: Puffer A mit linearem NaCl-Gradienten von o - o,4 M.

Säulendimension: 85 x 5,5 cm

Fraktionsvolumen: ca. 10 ml

4) Sephadex G-200 Gel Chromatographie:

Die konzentrierte Enzymlösung aus dem vorherigen Schritt wurde auf einer mit Puffer A äquilibrierten Sephadex G-200 Säule (125 x 4,6 cm) chromatographiert. Die hochaktiven Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert.

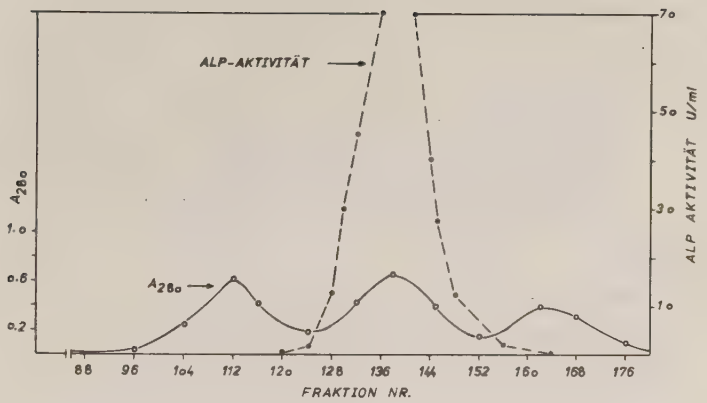


Abb. 24: Gelfiltration von ALP aus Kälberdünndarm an Sephadex G-200.

Säule: 125 x 4,6 cm

Fraktionsvolumen: ca. 10 ml

Mittleres Durchflußgeschwindigkeit: 18 ml/Std.

5) Präparative isoelektrische Fokussierung:

Die hochgereinigte Enzymlösung, die nach Gelfiltration noch eine fremde Protein-Bande im PAAG-disc Elektrophorese zeigte, wurde weiter durch isoelektrische Fokussierung, wie unter A.1. beschrieben wurde, gereinigt. Die alkalische Phosphatase wurde in zwei Aktivitätsgipfeln aufgetrennt. Fraktion I mit dem isoelektrischen Punkt 4.4 zeigte im PAAG dis-Elektrophorese nur eine einzige Protein bzw. ALP Bande. Fraktion II (pI = 5.9) enthielt noch ein fremdes Protein, das durch Rechromatographie an DEAE-Cellulose entfernt werden konnte.

Abb. 25 zeigt die Auftrennungsdiagram der alkalischen Phosphatase aus dem Kälber-Dünndarm durch IEF im Saccharose Dichte-Gradienten mit Ampholine pH-Bereich von 3.5-7.

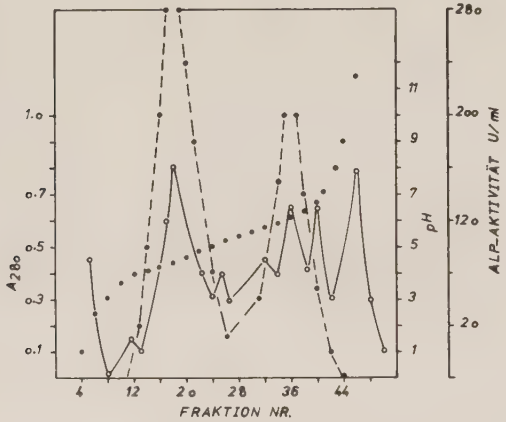


Abb. 25: Präparative isoelektrische Fokussierung von Kälber-Dünndarm-ALP (nach Sephadex G-200). Ein linearer pH-Gradient zwischen 3,5 - 7 wurde mit Trägerampholin 2 %ig in einer linearen Saccharose Gradienten gebildet.

Abb. 26 zeigt eine PAAC disk-Elektrophorese von Fraktion I der Kälber Dünndarm-ALP.

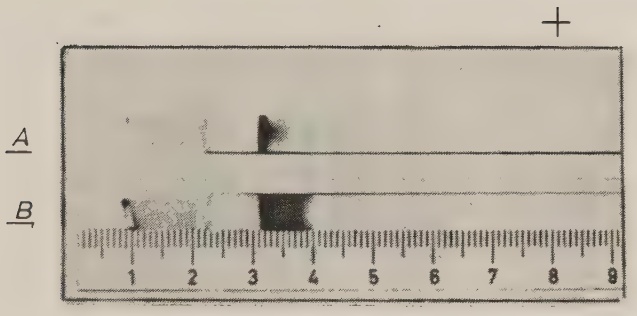


Abb. 26: PAAG-disk-Elektrophorese von Fraktion I der Kälber-Dünndarm-ALP.
Trenngel 8 %ig; Puffer Tris/Glycin pH 8,3; 4 mA pro Röhrchen; Laufzeit 90 Min. bei 5 °C.

A: Protein-Färbung

B: Enzym spezifische Färbung

Das hochgereinigte ALP-Präparat aus dem Sephadex G-200 Reinigungsschritt sowie Fraktion I wurden zur Immunisierung verwendet.

B.2.: Alkalische Phosphatase aus anderen Kalb-Organen:
ALP aus folgenden Kalb-Organen wurden gemäß der Dünndarm-ALP Aufarbeitung bis zum QAE Sephadex Reinigungsgrad angereichert: Niere, Herz, Leber, Milz, Pankreas sowie die Placenta von Kühen. Diese Präparate wurden zum Zwecke einer komparativen biochemischen und immunologischen Untersuchung isoliert.

Tabelle 6

Reinigungsschema der alkalischen Phosphatase aus Kälber-Dünndarm

Reinigungsschritt		Gesamt Aktivität (U)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungs-faktor (n-fach)	Ausbeute (%)
Butanol-Extrakt		12380	5627,3	2,2	1	100
Ammoniumsulfat-fraktionierung		11020	918	12,0	5,5	89
Acetonfraktionierung		9978	313,5	30,1	13,7	80,6
QAE-Sephadex A-50 Chromatographie		9440,5	79	119,5	54,3	76,3
Sephadex G-200 Gel-Chromatographie		8420	35	240,6	109,4	68
Präparative isoelektrische Fokussierung & Sephadex G-200 Chromatographie	Fraktion I	4212	10	420	190,9	34
	Fraktion II*	2105	6,2	339,5	154,3	17

* : Spezifische Aktivität nach DEAE-Cellulose Chromatographie war 392

C. Andere präparative Methoden zur Reinigung der alkalischen Phosphatase:

Die Verfahren: Hydroxylapatit (HPA), Cellulose Phosphat, Affinitätschromatographie, Zonen-Elektrophorese sowie Isotachophorese im PAA-Gele wurden auf ihre Effektivität zur Reinigung der ALP untersucht. Hierist eine kurze Beschreibung der Anwendungsmöglichkeiten der einzelnen Verfahren:

1) Hydroxylapatit (HAP) Chromatographie: Die Herstellungsweise von HAP im Labormaßstab ist ein wichtiger Faktor für die Effektivität dieser Methode. Verschiedene Modifikation der Original-Methode von Tiselius [95] zur Darstellung des Hydroxylapatit's wurden herangezogen [96;97]. Im Bezug auf die Kristallbildung bzw. die Durchflußgeschwindigkeit und Stabilität der Säulenfüllung erwies sich die Methode von Mazin [96] als die bessere. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Anreicherungsergebnisse der alkalischen Phosphatase aus drei verschiedenen Organen unter verschiedenen Elutionsbedingungen. Als Ausgangspräparate dienten die aus dem Ammoniumsulfat Fraktionierungsschritt gewonnenen Produkte. Tabelle 7.

Tabelle 7:

Reinigung der ALP durch Chromatographie auf Hydroxylapatit-Säulen

Puffer		0,02 M Phosphat pH 6,8	0,04 M Phosphat pH 6,8	0,05 M Tris/HCl pH 7,5	0,2 M Borat/KOH pH 7,8
Gradient		0 -0,3 M Phosphat	0 - 3 M NaCl	0 - 4 M NaCl	0 - 4 M NaCl
Kälber Dünndarm -ALP	Elution bei	0,08 M	0,18 M	2,7 M	1 M
	Reinigungs-faktor	10,0	8,8	9,0	9,5
	Ausbeute %	52	65	70	65
Placenta -ALP	Elution bei	0,1 M	0,2 M	3,2 M	1,5 M
	Reinigungs-faktor	4,2	3,6	3,9	4,5
	Ausbeute %	45	60	64	67
Nieren -ALP	Elution bei	0,15 M	0,22 M	3,5 M	2,1 M
	Reinigungs-faktor	6,8	6,4	5,8	6,0
	Ausbeute %	40	56	60	58

Bei allen Puffer-Systemen wurde die ALP-Aktivität als ein einziger breiter Aktivitätsgipfel eluiert.
Die Anwendung von HPA-Chromatographie könnte an Bedeutung gelangen, wenn der Nachteil dieser Methode, der in der relativ geringen Ausbeute liegt, was möglicherweise auf die Teilinaktivierung des Enzyms zurückzuführen ist, überwunden werden kann.

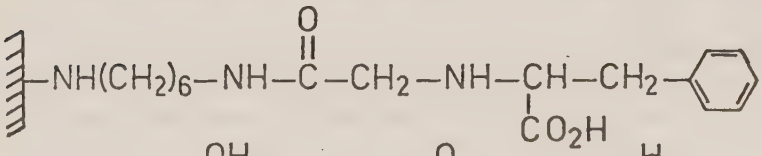
2) Cellulose-Phosphat:

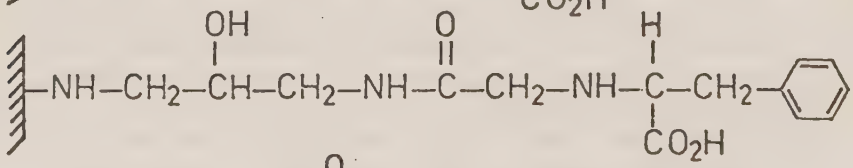
Dieser Ionenaustauscher wurde hier wegen der möglichen Bindung von ALP aufgrund ihrer Affinität zu Phosphaten zur Reinigung dieses Enzyms eingesetzt. Alkalische Phosphatase-Präparate wurden jedoch auch bei Anwendung verschiedener Pufferionen (Tris, Borat, Phosphat) nicht an den Träger gebunden oder retardiert. Daher eignet sich Cellulosephosphat nicht in dieser Form zur Reinigung der ALP.

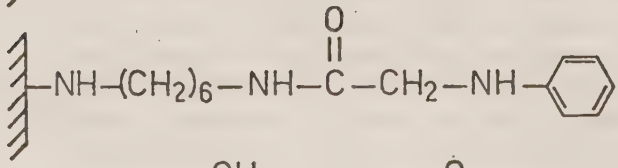
3) Affinitätschromatographie und hydrophobe Chromatographie:

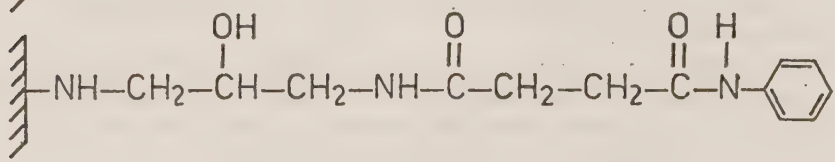
Die Affinitätschromatographie hat in den letzten zehn Jahren in der Biochemie als eine der effektivsten Techniken bei der Isolierung von Enzymen und anderen biologischen Substanzen an Bedeutung gewonnen. Die Anwendung dieser Technik erfordert eine spezifische Wechselwirkung zwischen einem Enzym und seinem Inhibitor, bzw. Substrat oder Substratanalogem, der an einem Trägermaterial wie Sepharose oder Cellulose direkt oder über einer Spacer gebunden ist.
Da alkalische Phosphatase aus Dünndarm und Placenta eine spezifische Affinität zu L-Phe haben, wurde hier L-Phe an aktivierte Sepharose gebunden, und die Möglichkeit einer affinitätschromatographischen Reinigung dieser Phosphatase untersucht.
Die Bindung von L-Phe an aktivierte Sepharose wurde nach Cuatrecasas [97;98] durchgeführt. Die alkalische Phosphatasen aus menschlichem Dünndarm und Placenta (Aceton Reinigungsschritt) wurden je auf eine L-Phe-Sepharose Säule (15 x 2 cm)

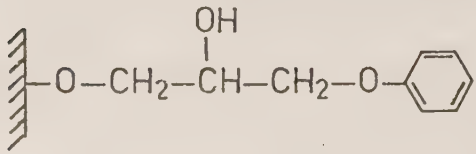
aufgetragen und mit o,2 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 eluiert. Beide Phosphatasen wurden nicht gebunden und die enzymatische Aktivität wurde im Säulenausschlußvolumen eluiert. Es wurde von Fishman [99] berichtet, über die Anreicherung der ALP durch Anwendung von L-Phe-Sepharose. Diese Autoren benutzten einen abnehmenden Ammoniumsulfat-Gradienten zur Elution des Enzyms. Dies brachte eine 1- bis 2-facher Anreicherung der ALP, was sehr wahrscheinlich nicht auf die spezifische Bindung des Enzyms an L-Phe Rest sondern auf eine hydrophobie Wechselwirkung zurückzuführen ist.
Daher wurde hier auf die Möglichkeit einer Reinigung der Phosphatase durch die Ausnutzung der hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen untersucht.
Folgende Sepharose-Derivate wurden syntherisiert:
1 bis 4 nach (98;1oo;1o1;1o8) ; 5 nach (1o3) .

(1) 

(2) 

(3) 

(4) 

(5) 

Von jedem synthetischen Träger wurden zwei Säulen (15 x 2 cm) vorbereitet. Nach Äquilibrierung in o,2 M Tris/HCl Puffer pH 7,5 wurde mit einem 1,5 bis Null M linearen Ammoniumsulfat-Gradienten (1,5 L) eluiert.
Ein ALP-Enzympräparat vom Acetonfraktionierungsschritt aus menschlichem Dünndarm wurde zu diesen Untersuchungen verwendet.
Folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen:

Tabelle (8) : Hydrophobe-Chromatographische Reinigung der ALP aus menschlichem Dünndarm.

Träger-Art	Elution* M-$(NH_4)_2SO_4$	Ausbeute %	Reinigungsfaktor (n-fach)
1	0,85	80	4,8
2	1,00	85	4,0
3	0,7	76	5,0
4	0,7	82	5,2
5	0,95	90	4,6

* Molarität bei höchstaktiver Fraktion.

Aus diesen Ergebnissen ist zu sehen, daß eine bedeutende Anreicherung der ALP durch hydrophobe Wechselwirkung des Enzyms mit dem an der Sepharose gebundenen Seitenketten erzielt werden kann.
Es ist unwahrscheinlich, daß eine spezifische Bindung des Enzyms an seinem Inhibitor (L-Phe) stattgefunden hatte, sondern eher eine hydrophobe Adsorption, was durch einen besseren Reinigungsfaktor für ALP an Anilin-Sepharose bestätigt wurde.
Eine ähnliche Anreicherung der ALP aus Nieren-Präparaten wurde auch durch Anwendung von Träger Nummer 2 und 4 erzielt, was eine spezifische Bindung an Phe-Rest ausschließt, da dieses Enzym nicht die gleiche Affinität zu L-Phe hat wie ALP aus Dünndarm und Placenta.

Zum anderen wurde festgestellt, daß modifiziertes L-Phe, wie (N-methyl-L-Phe, N-carbobenzoxy L-Phe, P-amino-L.Phe, P-nitro-L.Phe, 3- und 4- fluoro-L.Phe) die Dünndarm- und Placenta-Phosphatase nicht hemmt.

4) Präparative Polyacrylamid Gel Elektrophorese:

Die Anwendung dieser Methode zur Reinigung eines Enzyms hängt von mehreren Faktoren ab [104]. Die elektrophoretischen Beweglichkeiten der einzelnen Komponenten einer Proteinprobe müssen gewisse Unterschiede haben. Je höher und größer die Unterschiede der Mobilität der verschiedenen Proteine sind, desto besser eignet sich diese Technik als präparative Methode. Andere Faktoren wie die Pufferart, pH-Wert, Gelkonzentration, ...usw. beeinflußen in der einen oder anderen Weise die Trenneffektivität. Dazu müssen die verwendeten Geräte eine optimierte Kühlung der Gele, sowie Elution der aufgetrennten Proteinbanden in möglichst kleinen Puffervolumen haben.

Für diese Versuche wurde das Gerät von (Canalco-Holland) verwendet. Diese Versuche wurden hauptsächlich nach den Richtlinien der Herstellerfirma durchgeführt.

Folgende Elektrophorese-Systeme wurden untersucht:

	System I	System II	System III
Elektroden-Puffer	Tris/Borat o,o8 M pH 8,5	Tris/Glycin o,o84 M pH 8,3	2-Amino-2methyl propandiol/HCL 0,2 M pH 9,o
Elutions-puffer	Trenngel-Puffer + o,2 M NaCl + o,o2 mM Zn^{2+} + 5 mM Mg^{2+}		
Trenngel - Puffer	1,5 M Tris/Cl pH 8,6	1 M Tris/Cl pH 8,6	1 M 2 A 2 MPD/Cl pH 9,5
Spacergel-Puffer	Tris/H_3PO_4 + 3ml TEMED o.5 M, pH pH 6,8	Tris/H_3PO_4 + 3 ml TEMED o.5 M pH 6,8	2A2MPD/Cl + 3 ml TEMED o.3 M pH 7,8
Gel-Konzentration	Trenngel T = 6 % Acryl: BIS = 40 : 1	Spacergel T = 4 % Acryl : BIS = 15 : 1	
Polymerisation	Trenngel; mit Ammoniumpersulfat Spacergel; mit UV-Licht.		
Länge der Gele	Trenngel: 4 - 5 cm Spacergel : ca. 2 cm		

Die folgende Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse einiger Untersuchungen zur Reinigung bzw. Auftrennung der alkalischen Phosphatase aus Kälber-Dünndarm sowie aus der menschlichen Placenta, anhand von drei verschiedenen Systemen:
Als Proben dienten Präparate aus dem ersten Ionenaustauscher Chromatographie Reinigungsschritt.

		System I	System II	System III
	Reinigungs-faktor	2,6	2,1	2,5
Dünndarm - ALP (Kalb)	Ausbeute %	75	70	70
	Reinigungs- a*	6,9	5,8	6,2
	faktor b*	8,5	6,5	7,3
	Ausbeute a*	36	32	34
	% b*	45	39	40

a* : Fraktion I ; b* : Fraktion II

Die kleineren Reinheitsfaktor und Ausbeute für Kälber-Dünndarm-ALP beruht auf der niedrigeren elektrophoretischen Beweglichkeit, die zu einem großen Elutionsvolumen führt. Jedoch für Placenta-ALP scheint diese Methode gut geeignet zu sein, insbesondere weil dieses eine viel höhere Mobilität als die Darm-Phosphatase hat. Nach Elektrophorese enthielten beide Präparate noch Fremdproteine. die im Falle des Placentaenzyms völlig durch Gelfiltration an Sephadex G-200 völlig entfernt werden kann. Aber Darm-Phosphatase enthielt auch nach Gelfiltration noch zwei weitere kleine Protein-Banden.
Die Placenta-ALP wurde in der Elektrophorese zu zwei Aktivitätsgipfeln aufgetrennt, die aber zum Teil überlappen.
Im Trenngel blieb immer ein kleiner Teil der ALP-Aktivität als schwache diffuse, sehr langsam wandernde Bande zurück, die wahrscheinlich durch die Bildung von Aggregaten entstanden war.
Da Leber-Phosphatase auch eine hohe Mobilität hat, kann diese Methode zu ihrer Reinigung verwendet werden.

5. Präparative Isotachophorese in Polyacrylamid-Gelen: (ITFPG)

Die Isotachophorese-Technik hat in den letzten fünf Jahren für analytische und präparative Zwecke in der Proteinchemie erheblich an Bedeutung gewonnen. Es handelt sich hierbei um eine elektrophoretische Methode, in der verschiedene, gleichsinnig geladene Ionenarten entsprechend ihrer Nettoelektrophoretischen Beweglichkeit getrennt werden, und ist dadurch charakterisiert, daß sie den Ionen dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit aufzwingt.
Mehrere Faktoren beeinflussen die Auftrennung von Proteinen im ITFPG-System [105].
Als wichtigste wären:
1) pH-Bereich und Konzentration des verwendeten Ampholins;
2) pH und Konzentration des Gel-Puffers;
3) angelegte Spannung und Dauer der Elektrophorese;
4) Gelzusammensetzung. Diese Vielzahl von Faktoren erlaubt viele Variationsmöglichkeiten, um optimale Bedingungen für eine spezifische Auftrennung eines bestimmten Proteins zu entwickeln.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Systeme untersucht:
System I:
Kathoden Puffer (terminating elektrolyte):
o,o3 M Tris/Glycin, pH 8,5
Anoden Puffer: o,o8 M Tris/H_2SO_4 pH 7,1

Gelpuffer: 1,2 M Tris/H_3Po_4 + 3 ml TEMED pH 8,8
(leading elektrolyte)
Acrylamid/BIS = 32 : 2 in 1oo ml H_2O.
Ammoniumpersulfat: o,2 %ig
Riboflavin: 0,005 %ig.
Gelzusammensetzung: 5 ml Gelpuffer
10 ml Acryl /BIS Lösung
10 ml Ammoniumpersulfat
5 ml Riboflavin
o,5 ml Ampholine pH (3,5 - 7)
auf 50 ml mit 10 %ige Saccharose Lösung.

System II: Wie System I mit folgenden Änderungen:

Kathodenpuffer: Tris / EACA
(1,5 g/ 30 g) L pH 8,9
Gelpuffer: Tris/HCl + 3 ml TEMED pH 8,1
1,5 M

System III: Wie System II mit folgender Änderung:
Gelzusammensetzung: 5 ml Gelpuffer
10 ml Acrylamid/BIS (2o g Acryl + 1 g BIS in 1oo ml H_2O)
10 ml 25 % ige Saccharose Lösung.
5 ml H_2O
20 ml o,2 %ige Ammoniumpersulfat Lösung
+ o,5 ml Ampholine pH (3,5-7)

Als Proteinprobe diente alkalische Phosphatase aus dem Kälber-Dünndarm, die bis zum Gelfiltration-Reinigungsschritt angereichert worden war. Die Proteinproben (ca. 30 mg) wurden gegen den jeweiligen Kathoden-Puffer dialysiert. Für die präparative Isotachophorese Auftrennung diente eine vertikale Elektrophorese Apparatur (Canalco-"Prep-disc"-Säule). In allen Experimenten wurde PAA-Gele von ca. 7 cm Länge in einer PD 320 Trennsäule verwendet. Die dialysierte Proteinprobe mit o,1 ml Ampholine und o,2 g Saccharose in einem Volumen von 2 - 3 ml wurde mit Hilfe eines dünnen Schlauches durch den Kathoden-Puffer auf die Geloberfläche aufgetragen. Als Elutionspuffer wurde der entsprechende Gelpuffer mit (o,1 M NaCl, o,2 mM Zn^{2+} und 5 mM Mg^{2+}) benutzt. Dieser Puffer wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe aus einem Reservoir durch die auf ein möglichst kleines Volumen eingestellte Elutionszelle gepumpt. Der Anoden-Puffer muß luftblasenfrei in den unteren Anodenraum eingefüllt werden. Die Säule wurde durch zirkulierendes kaltes Wasser auf 5 - 10 °C gehalten. Das Experiment wurde dann bei einer konstanten Spannung von 400 V durchgeführt.

Die Elutionsgeschwindigkeit war auf ca 3o ml/h eingestellt, und es wurden Fraktionen von ca 1o ml gesammelt. Nach Beendigung des Versuches (ca 10 Stunden) wurden die Fraktionen auf ihre ALP-Aktivität untersucht und die hochaktive Fraktionen vereinigt, dialysiert, konzentriert und anschließend über Sephadex G-200 chromatographiert. Folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen:

		System I	System II	System III
Kälber-Dünndarm-ALP	Reinigungs-faktor	1,7	a* 2 b* 1,5	a* 2,1 b* 1,4
	Ausbeute %	87	a* 53 b* 21	a* 56 b* 25

a*: Fraktion bzw. Aktivitätsgipfel a; b* Fraktion bzw. Aktivitätsgipfel b.

Tabelle 10: Isotachophoretische Reinigung der ALP aus Kälber-Dünndarm

Die Elution der ALP-Aktivität erfolgte bei dieser Technik (unter den hier verwendeten Bedingungen) innerhalb von 12 Stunden. Dabei wurde das aufgetragene Enzym in den Systemen II und III in zwei Aktivitätsgipfeln aufgetrennt. Im Gegensatz zur präparativen PAA-Gel-Elektrophorese wurde hier die enzymatische Aktivität in relativ viel kleineren Volumen eluiert und eine Gesamt-Ausbeute von ca. 80 % erzielt.
Fraktion "a" war, wie durch eine analytische PAA-disc-Elektrophorese gezeigt werden konnte, ein reines Enzym mit etwa gleicher spezifischer Aktivität wie sie durch präparative IEF erzielt wurde. Fraktion "b" enthielt noch ein fremdes Protein, das durch Rechromatographie an DEAE-Cellulose entfernt werden konnte.
Damit erwies sich diese Technik als eine relativ gute präparative Methode zur Reinigung bzw. Auftrennung der alkalischen Phosphatase.

6. Molekulargewichtsbestimmung:

Drei verschiedene Methoden wurden zur Molgewichtsbestimmung der gereinigten alkalischen Phosphatase herangezogen.

1) Gelfiltration:

Das MG wurde nach Andrews [106] durch Gelfiltration über Sephadex G-200 bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 27 dargestellt und in der Tabelle 11 zusammengefaßt.

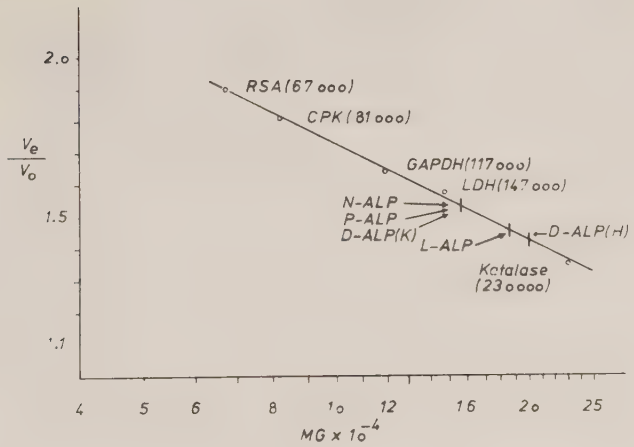


Abb. 27: Bestimmung des Molekulargewichtes von ALP aus Dünndarm, Leber, Placenta und Niere des Menschen sowie aus Kälber Dünndarm durch Gelchromatographie auf Sephadex G-200.

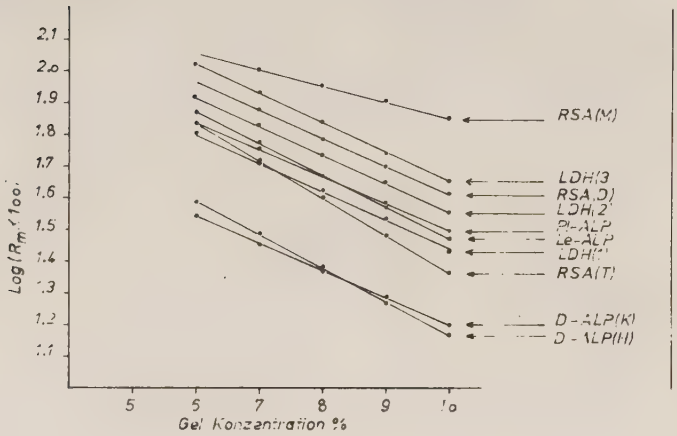
Säule: 130 x 2,6 cm

Elutionspuffer: 0,05 M Tris/HCL Puffer pH 8,0 + 0,2 M NaCl.

2) Polyacrylamid Gel-disc Elektrophorese:

Elektrophorese in verschiedene PAA-Gel Konzentrationen nach Heidrick et al [107].

Die Ergebnisse sind in Abbildungen 28 A & B dargestellt.



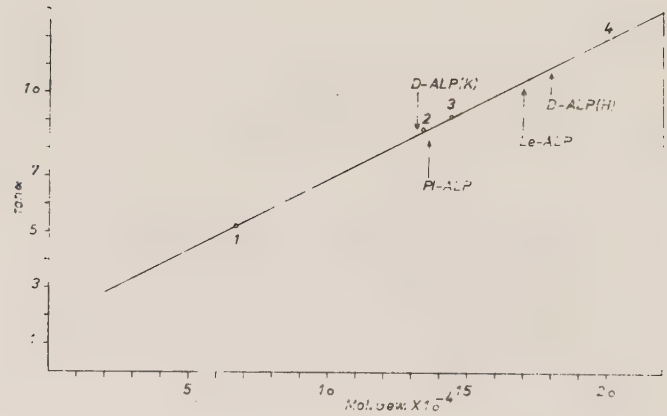


Abb. 28: Molekulargewichtsbestimmung von ALP aus Dünndarm, Leber und Placenta des Menschen sowie aus Kälber-Dünndarm durch Elektrophorese in verschiedene PAA-Gel-Konzentrationen, nach Heidreck et al (107).

3) Dodecylsulfat-Gel-Elektrophorese:

SDS-Elektrophorese wurde durchgeführt, um festzustellen, ob die ALP-Isoenzyme als Multimere vorliegen und in diesem Fall das MG der Untereinheiten zu bestimmen.[108; 109]

Die Enzyme wurden unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (10 % SDS, 8 M Harnstoff, 1 % Mercaptomethanol) einer Elektrophorese unterworfen. Weitere Einzelheiten sind unter Methoden beschrieben.

Abbildung 29 stellt die Ergebnisse dar.

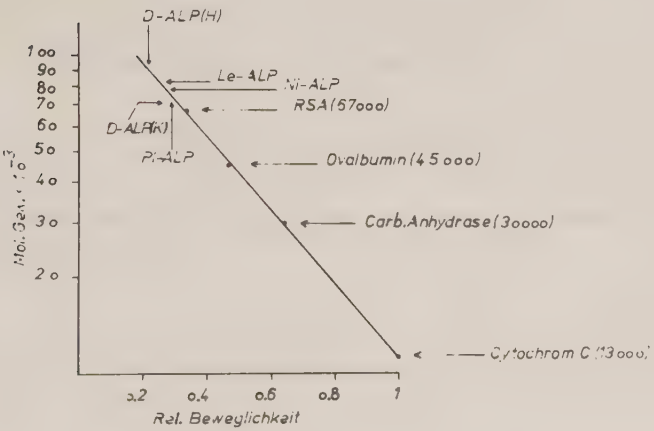


Abb. 29: Bestimmung des Molekulargewichts von ALP aus Dünndarm, Leber, Placenta und Niere des Menschen sowie aus Kälber-Dünndarm durch Dedecylsulfat PAAG Elektrophorese.

Bei allen MG-Bestimmungen wurden nur die rein dargestellten Isoenzyme verwendet:

1) Menschliche Dünndarm-ALP (D-ALP(M): Fraktion I nach IEF)
2) Placenta-ALP (Pl-ALP): Fraktion II nach IEF
3) Leber-ALP (Le-ALP): Fraktion II nach IEF
4) Nieren-ALP (Ni-ALP): Fraktion II nach IEF, sowie die Hauptfraktion nach Neuraminidase Behandlung.
5) Kälber-Dünndarm-ALP (D-ALP(K): Fraktion I nach IEF.

Folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen:

Enzym	D-ALP(M)	D-ALP(K)	Pl-ALP	Ni-ALP	Le-ALP
Methode					
Sephadex 1)G-200 Gelfiltration nach (Andrews)	203 000	157 500	157 500	157 500	186 500
PAA-Gel 2)Elektrophorese nach (Heidrick)	180 000	132 000	136 000	nicht bestimmt	170 000
SDS-Elek- 3)trophorese. nach (Weber & Osborn)	Eine** Unter-einheit von MG 89 000	Eine Unter-einheit von MG 71 000	Eine Unter-einheit von MG 73 000	Eine Unter-einheit von MG 78 000	Eine Unter-einheit von MG 81 500

**: Bei Dünndarm-ALP (M) wurde noch eine dünne Bande von MG 115 ooo im SDS-Gele gefunden, die als Verunreinigung oder Artefakte betrachtet wurde.

Tabelle 11: Molekulargewichtsbestimmung der ALP-Isoenzyme aus Dünndarm, Leber, Placenta, Nieren des Menschen sowie aus Kälber Dünndarm

7. Elektrophoretische Eigenschaften der alkalischen Phosphatase:

Fast alle verschiedenen Arten von Trägermedien für die Zonen-Elektrophorese wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Eignung zur Trennung der ALP-Isoenzyme bzw. multiplen Formen untersucht.
Unter anderem wurden: Cellulose Acetat-Folien, Agarose-, Stärke-, und PAA-Gele sowie Mischungen aus PAA- und Agarose-Gelen benutzt. Dabei erwies sich die Elektrophorese auf PAA-Gelen als die zuverlässigste, während bei den anderen Trägermedien nur verschmierte Banden auftraten.
Im folgenden werden die Ergebnisse mit Stärke- sowie mit PAA-Gel-Elektrophorese zusammengefaßt:

Stärke Gel Elektrophorese:

Um bessere Auftrennung der einzelnen ALP-Banden zu erzielen, wurde die Elektrophorese in verschiedenen Puffer-Systemen durchgeführt. Folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen:

Tabelle 12: Elektrophoretische Auftrennung der ALP in Stärke-Gelen in verschiedenen Puffer-Systemen

	Puffer-System		Stärke Gel	Elektrophorese	"Mowing boundary"	Bemerkungen
1)	Elektrodenpuffer Tris/Barbiturat/Glycin-pH 8,8 11,3 g Tris; 3,25 g Barbital-NA o,52 g Barbital-Säure 14,1 g Glycin per Liter	Gelpuffer 0,05 M H_3BO_3/KOH + o,o5 M KCL pH 8,8	11 % auf einer Gel-Platte von 24 x 16 cm	Bei 700 bis 800 V und 5 ° C.	Nach 5 Stunden Elektrophorese war die Wanderungsstrecke in Richtung Anode ca. 10 cm	Während der Elektrophorese stieg die Stromstärke bis auf 120 mA. Auf die Filterpapier-Brücken scheiden sich Salze aus. Abbildung (30)
2)	o,3 M Borat/KOH pH 8,7.	o,o76 M Tris/Citrat pH 8,7			Nach 5 Stunden; ca. 11 cm	Keine Salz-Ausscheidung an den Filterpapier Brücken. Stromstärke ziemlich konstant. Abbildung (31)
3)	o,1M Citrat/NaOH pH 6,o	o,o5 M Maleate/NaOH pH 6			Nach 5 Stunden; ca. 5 cm	Starke Erhöhung der Stromstärke Abbildung (32)
4)	o,38 M H_3BO_3/LiOH pH 8,5	o,o16 M Tris/Citrat pH 8,5			Nach 5 Stunden; ca. 11 cm	Enzym-Banden waren zwar etwas verschmiert, aber deutlich als solche zu erkennen. Abbildung 33
5)	o,3 M Barbital-Na Barbitur Säure o,o7 M pH 8,5	o,o5 M Tris/Borat pH 8,5			Nach 5 Stunden; ca. 10 cm.	Ähnliche elektrophoretischen Verhalten wie (4).

Abb 30: Stärke-Gel-Elektrophorese von ALP aus folgenden menschlichen Organen (von links nach rechts): Dünndarm, Placenta, Niere, Knochen, Leber, Herz, Milz, Pankreas, Lunge, Gehirn, Galle.

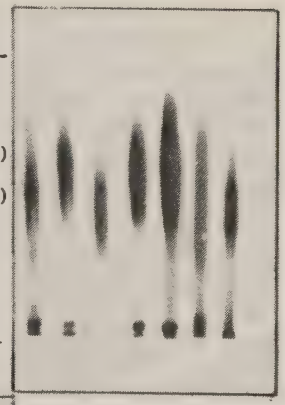
im Puffersystem (1).

Abb. 31: Stärkegel-Elektrophorese von ALP aus folgenden menschlichen Organen (von links nach rechts):

Dünndarm (aus den ersten eluierten Fraktionen)
" (aus den späteren eluierten Fraktionen)
" (aus den ersten eluierten Fraktionen)

Leber-ALP
Placenta-ALP
Nieren-ALP
Knochen-ALP

(im Puffersystem II)



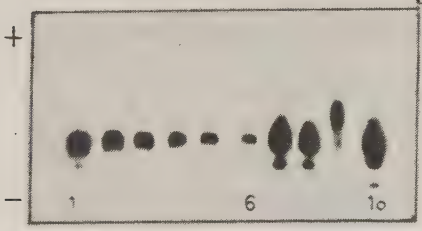


Abb. 32: Stärke Gel-Elektrophorese von ALP aus menschlichen Organen 1-6: Dünndarm-ALP folgender Konzentrationen an ALP-Aktivität: 64; 32; 16; 8; 4; 2 U/ml.

7,8: Dünndarm-ALP 80 U/ml.
9 : Placenta-ALP 12 U/ml.
10 : Niere-ALP 40 U/ml. (im Puffersystem III)

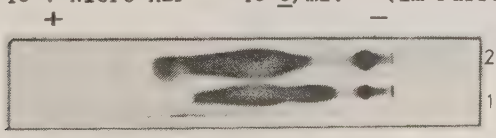


Abb. 33. Stärke-Gel-Elektrophorese von alkalischer Phosphatase aus Dünndarm (1) und Placenta (2) des Menschen im Puffer-System IV

Die Elektrophorese von alkalischen Phosphatase-Präparaten aus verschiedenen Gewebeextrakten auf Stärke-Gelen zeigte deutliche Heterogenität, jedoch die Auftrennung zu klar begrenzten Banden ist auf diesem Träger-Medium nicht möglich. Auffallend bei der Stärke-Gel-Elektrophorese war die Existenz einer langsam anodisch wandernden Bande bei allen untersuchten ALP-Präparaten. Sie könnte auf die Entstehung von Enzym-Aggregaten zurückzuführen sein, da sie auch bei hochgereinigten Enzym-Präparaten auftrat.

Polyacrylamidegel-Disk-Elektrophorese:

Die Prüfung des Reinheitsgrades während der Enzymreinigung und der Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit der ALP aus verschiedenen Organen, erfolgte durch Disk-Elektrophorese in PAA-Gelen. Dabei wurden verschiedene Puffer und PAA-Gel-Zusammensetzungen nach ihrer Effektivität zur Trennung der ALP-Enzympräparate untersucht. Die als geeignet gefundenen Elektrophorese-Systeme sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle 13:

	ml	Sammelgel	Trenngel	ml	Elektroden Puffer
System I	2	Acrylamid:BIS 12 g 2 g in 100 ml	Acrylamid: BIS 29 g : 1 g in 100 ml	2	Tris/Borat o,o5 M, pH 9,o
	1	Tris/HCl o,8 M pH 7,5 + 3 ml TEMED	Tris/Borat o,4 M, pH 9,5 + 3 ml TEMED	1	
	1	Riboflavin 100 mg per L.	Ammoniumpersulfat o,2 %ige Lösung	4	
	4	40 %ige Saccharoselösung	H_2O	1	
System II	wie I	Wie I außer Gelpuffer: Tris/Phosphat o,5 M; pH 6,8	Acrylymid: BIS 37,5 g: 1 g in 100 ml	2	Tris/Gly o,o3 M pH 8,3
			Tris/HCl 1,5 M; pH 8,6	1	
			Ammoniumpersulfat o,2 %ige Lösung	4	
			H_2O	1	

In diesen Puffer-Systemen, die im Laufe dieser Arbeit verwendet wurden, war es möglich, ALP-Aktivität in Proben von ca. 10 m U/ml enzymspezifisch nachzuweisen. (Normal-Blutserum enthält ca. 30 m U ALP ro ml). Die ALP-Isoenzyme aus verschiedenen Organen zeigen unterschiedliche Änderungsgeschwindigkeiten in diesen Gelen, und zwar war bei den Enzymen aus Placenta und Leber die Mobilität am höchsten.

Abb. 34 & 35 gibt die elektrophoretische Trennung einiger Phosphatasen aus verschiedenen menschlichen Organen wieder.

Abb. 34: PAAG Flach disk-Elektrophorese von ALP aus folgenden menschlichen Organen:

1-Placenta
2-Leber
3-Knochen
4-Nieren-ALP
5-Milz-ALP
6-Dünndarm-ALP

in Tris/Glycin Puf
System II; 300 V,
120 Min, 5°C.

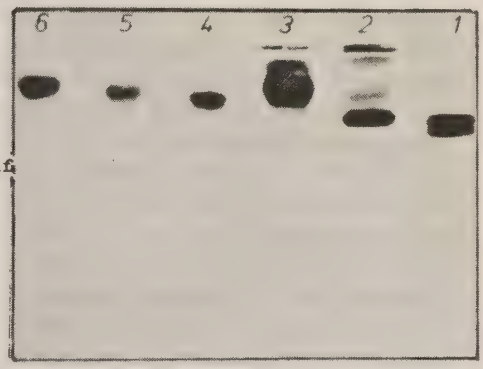
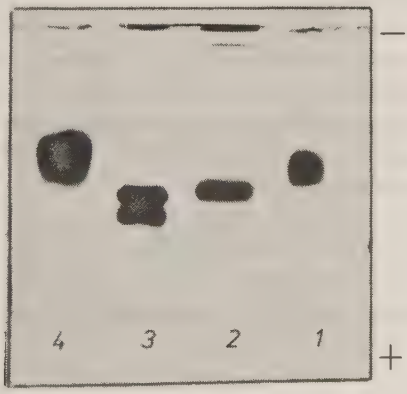


Abb. 35: PAAG Flachdisk-Elektrophorese von:

1-Knochen-ALP
2-Leber-ALP
3-Placenta-ALP
4-Dünndarm-ALP

im Tris/Borat Puffer

System I; 300 V,
150 Min, 5°C.



8. Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamid Gelen (IEFPG):

Wie vorher im Kapitel Enzymreinigung beschrieben wurde, dient die IEF-Methode zur präparativen Isolierung der Proteine. Auch wegen ihrer außerordentlichen Trenneffektivität wurde dieser Technik für analytische Zwecke in der Proteinchemie häufig verwendet. Die Auftrennung der Proteine beruht in diesem Fall mehr auf ihrem unterschiedlichen isoelektrischen Punkt als ihrer unterschiedlichen molekularen Größe. Verschiedene Techniken wurden in den letzten fünf Jahren für die Durchführung einer Fokussierung im PAA Gelen entwickelt[110,111]. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, sind für das eigentliche Protein durch mehrere Versuche die besten Bedingungen festzustellen. (siehe Methoden). Die Dauer der Fokussierung beeinflußt auch die Auftrennung der Proteine. Die Stabilität der pH-Gradienten wurde für die hier verwendeten Ampholine (pH Bereich 3,5 - 7 & 3,5 - 10) in Abhängigkeit von der Fokussierungsdauer untersucht.
Gel-Zusammensetzungen und andere Bedingungen sind im Kapitel Methoden beschrieben. Die pH-Werte in Gelen wurden nach 10 und 30 Stunden bestimmt. Wie Abb. 36 zeigt, wurde der pH-Gradient nach 30 Stunden deutlich verschoben, wobei eine Verflachung im mittleren Bereich auftrat. Unter den angewendeten Bedingungen war die ALP-Fokussierung nach 10 Stunden beendet.
Die enzymatische Nachweis- Grenze für ALP bei dieser Methode erfordert die Auftragung von mindestens o,5 Enzymeinheiten, d.h. bei Auftragen von 5o - 100 µl muß die Aktivität der ALP in der Probe mindestens 2 U/ml sein. Daher eignet sich diese Methode für die Untersuchung der ALP im Blutserum nicht.
Einer der wichtigen Faktoren, die diese Grenzen bestimmen, ist die Teilinaktivierung der ALP durch die Ampholine. Auch nach Inkubation der Gele im Puffer mit Mg^{2+} und Zn^{2+} Ionen konnte die Nachweisgrenze nicht wesentlich verbessert werden.

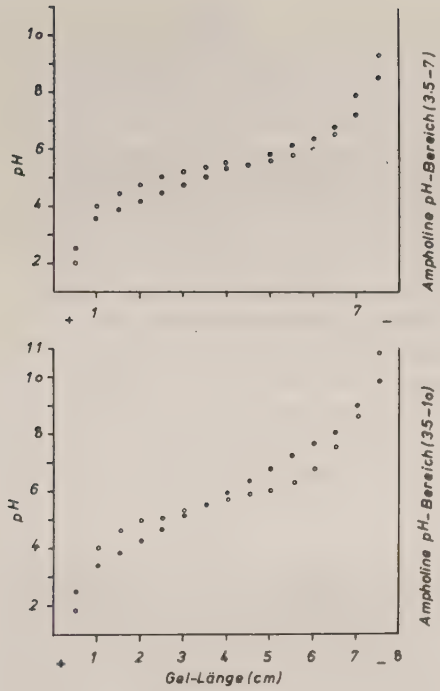


Abb. 36: Isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamid-Gel mit Trägerampholinen

a) pH-Bereich 3,5 - 7 und
b) 3,5 - 10 bei 5°C.

oooo Fokussierungsdauer 30 Stunden.

.... Fokussierungsdauer 10 Stunden.

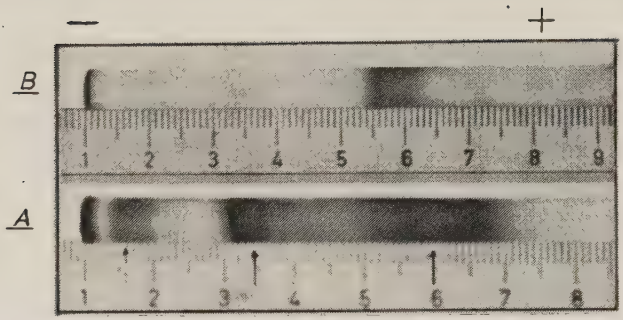


Abb. 36: Isoelektrische Fokussierung von menschlicher Dünndarm-ALP im Polyacrylamid Gel.

A: Angereichertes Dünndarm-ALP Präparat.

B: Dünndarm-ALP Fraktion I nach IEF.

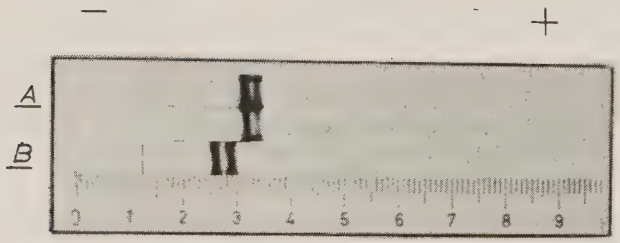


Abb. 37: PAAG-disK-Elektrophorese von:

A: Placenta-ALP

B: Placenta-ALP nach Neuraminidase-Behandlung.

Trenngel 7,5 %; Tris/Glycin Puffer pH 8,3;

Laufzeit 120 Min bei 5°C; 5 mA pro Röhrchen.

Die IEFPG von gereinigter ALP aus menschlichem Dünndarm zeigte drei enzymatisch aktive Banden (Abb. 36 A). Diese Banden-Muster entsprechen sowohl qualitativ als auch quantitativ dem Elutionsbild im präparativen IEF im Saccharose-Dichte-

gradienten.
Abbildung 36 B zeigt die IEFPG der isolierten Hauptfraktion der Darmphosphatase.
Die elektrophoretische Mobilität dieser Enzym-Formen wurde nicht durch Neuraminidase-Behandlung beeinflußt.

- Ein völlig anderes elektrophoretisches Verhalten zeigten die ALP aus anderen menschlichen Organen.

Das Enzym aus der Placenta (Sephadex G-200 Schritt) ließ sich in der Disk-Elektrophorese in zwei Banden auftrennen, während in der IEFPG mindestens 8 Banden unterschiedlicher Intensität auftraten. Abb. 37 & 38 A.
Die aus dem Scan-Elektropherogram errechneten prozentualen Anteile betrugen in der Reihenfolge abnehmender isoelektrische Punkte: 6 : 31 : 17 : 13 : 17 : 12 : 4.
Nach Inkubation dieses Präparates mit Neuraminidase (von Glostridium Perfringens), das die Spaltung von Sialinsäureresten katalysiert, zeigten sich in der PAAG-Disk-Elektrophorese dieselben zwei Banden, aber mit geringerer elektrophoretischer Beweglichkeit. Abb. B. In der IEFPG zeigte aber das so behandelte Enzym eine deutliche Verschiebung seiner Lage im pH-Gradienten zu höheren Werten und ein völlig anderes Bandenmuster. Nach extensiver Behandlung mit Neuraminidase zeigte die Placenta-ALP immer noch 4 Banden.
Abb. 38 B & C. Im Falle einer nicht extensiven Inkubation mit Neuraminidase wird nur eine partielle Degradation der Sialinsäurereste erzielt, was zu einem sehr heterogenen ALP-Präparat führt. Die Isofokussierung von während der Inkubation zu verschiedenen Zeiten entnommenem Proben zeigte im PAA-Gel unterschiedliche Hererogenität, die auf statistisch unterschiedliche und unvollständige Abspaltung der Sialinsäure-Reste zurückzuführen ist. In manchen Proben konnten mehr als 20 Banden gezählt werden. Jede der durch IEF im Dichte-Gradienten isolierten zwei Placenta-ALP Fraktionen zeigte im IEFPG Bandenmuster, die zusammen denjenigen von Präparaten vor dem Fokussierungsschritt entsprechen. Die ALP-Aktivität wurde durch Inkubation mit Neraminidase nicht beeinflußt.

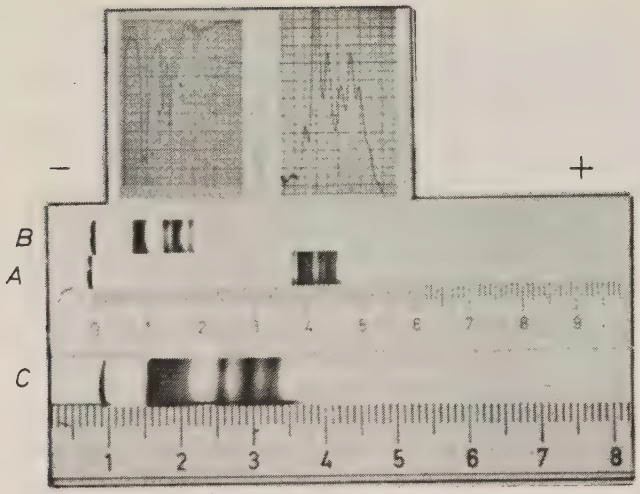


Abb. 38: Isoelektrische Fokussierung von Placenta-ALP im PAA-Gel.

A: Placenta-ALP der Anreicherungsstufe (Sephadex G-200)

B: Placenta-ALP (dasselbe Präparat) nach Neuraminidase-Behandlung.

C: wie B.

Die ALP aus menschlichen Nieren zeigte in besonders hohem Maße molekulare Heterogenität. Abb. 18 zeigt die graduelle Zunahme an negativer Ladung in verschiedenen Fraktionen aus Nieren-ALP Eluaten von einer DEAE-Cellulose-Säule. Isoelektrische Fokussierung des aus diesem Säulenlauf gepoolten Nieren-ALP Präparates zeigte viele enzymatisch aktive Banden im ganzen pH-Gradienten-Bereich. Abb. 39 A.
Extensive Neuraminidase-Behandlung des nach Sephades G-200 erhaltenes Präparates ergab in der IEFPG nur noch zwei deutlich voneinander getrennte enzymatisch aktive Banden. Abb. 39 B.

Daher wurde versucht, diese beiden Enzymfraktionen präparativ zu isolieren. Hierbei wurden ca. 1200 Einheiten eines durch Sephadex G-200 Chromatographie hochgereinigten Nieren-ALP Präparates extensiv mit Neuraminidase behandelt und schließlich durch IEF im Dichte-Gradienten oder durch Chromatographie an CM-Sephadex A-50 fraktioniert. Abb. 40 zeigt die Auftrennung der beiden Isoenzyme mit einer Hauptfraktion von pI = 6.o und einer kleineren Fraktion von pI = 4.3
Durch CM-Sephadex-A-50 Kationenaustauscher-Chromatographie konnten die beiden Isoenzyme wegen der bedeutenden Unterschiede ihrer isoelektrischen Punkte isoliert werden. Dabei wurde zuerst mit Citrat Puffer pH 4,5 die Fraktion mit pI 4,2 eluiert. Die Hauptfraktion konnte dann durch Erhöhung des pH auf 6,5 oder durch Erhöhung der Ionenstärke des Puffers eluiert werden.
Weitere Eigenschaften der beiden Fraktionen sind im Abschnitt "Immunologische Untersuchungen" beschrieben.
Die Phosphatase-Präparate aus Leber und Knochen zeigten ebenfalls molekulare Heterogenität bei der isoelektrischen Fokussierung in PAA-Gelen. Ihre elektrophoretische Mobilität wurde durch Neuraminidase-Behandlung verringert.
Ähnliche Effekte wurden bei ALP-Präparaten aus Milz, Pankreas, Gehirn und Herz beobachtet.
Eine quantitative Bestimmung des Gehalts an Neuraminsäure und Kohlenhydraten wurden für die rein isolierten Präparate aus Placenta und menschlichem Dünndarm durchgeführt.
Die Kohlenhydrate wurden nach (112) und die Sialinsäure nach (113) bestimmt.

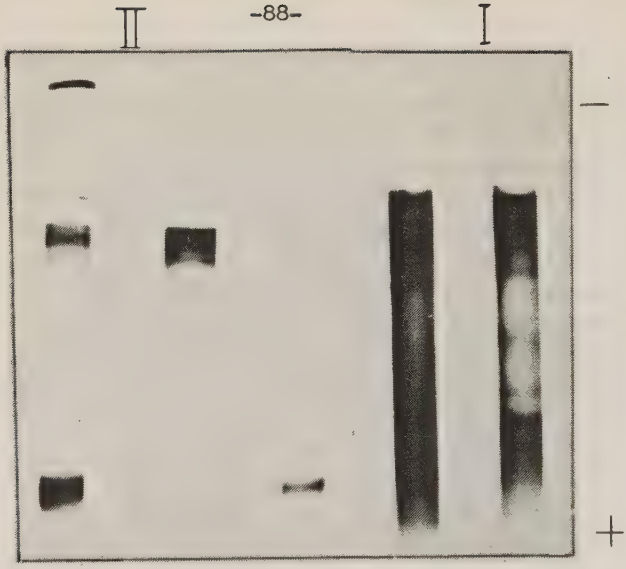


Abb. 39: Isoelektrische Fokussierung von ALP aus menschlicher Niere im PAA-Gel. Ampholin pH-Bereich 3,5 – 7.

I: Angereichertes Präparat

II: Auftrennung von Niere-ALP nach Neuraminidase-Behandlung.

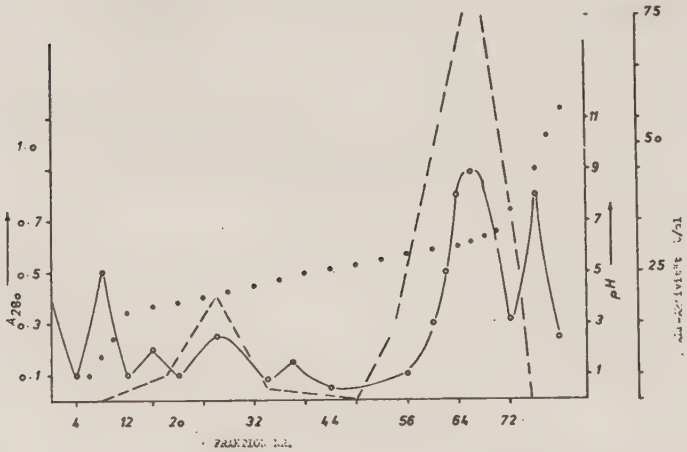


Abb. 40: Präparative isoelektrische Fokussierung von Neuraminidase behandelter Nieren-ALP (Anreicherungsstufe -Sephadex G-200) Trägerampholin pH-Bereich 3,5 - 7. 2 %ig.

Tabelle 14:

	MG**	Kohlenhydrate * %	Sialinsäure * Mole/Mole-Enzym
Dünndarm-ALP aus Menschen (Fraktion I)	187 ooo	20	o,oo
Placenta-ALP (Fraktion II)	146 ooo	14	3,oo
Nieren-ALP (Fraktion II)	156 ooo	16	4,oo

**: Mittelwert der Bestimmungen durch Gelfiltration, SDS und PAA-Gel Elektrophorese.

* : Mittelwert von drei Bestimmungen.

F. Biochemische Eigenschaften der alkalischen Phosphatase:

1. Hitzestabilität:

Die gegen o,o5 M Tris/HCl Puffer pH 8 dialysierte ALP-Enzymproben wurden je in einem auf 55°C gut temperierten Bad inkubiert und die Aktivitätsabnahme in verschiedenen Zeitabständen gemessen.
Abb. 41 zeigt die Ergebnisse.
Hierbei erwies sich die Placenta-Phosphatase als völlig stabil. Inkubation für 48 Stunden bei dieser Temperatur hatte keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität des Enzyms aus der Placenta. Dagegen tritt bei der Darm-Phosphatase im Laufe der Zeit eine graduelle Inaktivierung ein.
Die ALP aus Niere, Knochen und Leber wurden innerhalb einer Stunde völlig inaktiviert. Bei Erhitzung auf 65°C ging die ALP-Aktivität in Nieren-, Knochen-, Leber- sowie Dünndarm-Präparaten innerhalb von 30 Min. völlig verloren. Während die Placenta-ALP noch ca. 90 % der Originalaktivität aufwies.

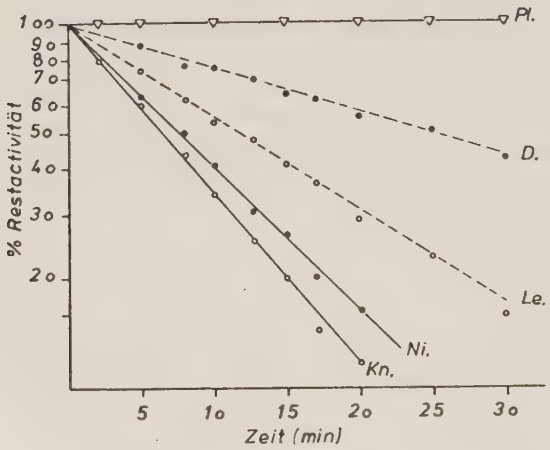


Abb. 41: Einfluß der Vorinkubationstemperatur auf die ALP-Aktivität aus Dünndarm (D), Placenta (pl), Leber(Le), Niere (Ni), und Knochen (Kn). des Menschen.

2. L-Phe-Effekt:

Der Effekt von L-Phe auf die ALP-Aktivität wurde bei Konzentrationen zwischen 1 und 1o mM untersucht. Dabei dienten als Vergleich Kontrollproben, die dieselbe Konzentration an D-Phe enthielten.
Abb. 42 zeigt die Ergebnisse.
Placenta- und Dünndarm-ALP zeigten besondere Spezifität gegenüber L-Phe, wobei ca. 80 % Aktivität bei 7 mM Konzentration an L-Phe verloren geht. Bei dieser L-Phe Konzentration wurden die ALP aus Niere, Knochen und Leber nur zu ca. 10 % inhibiert.

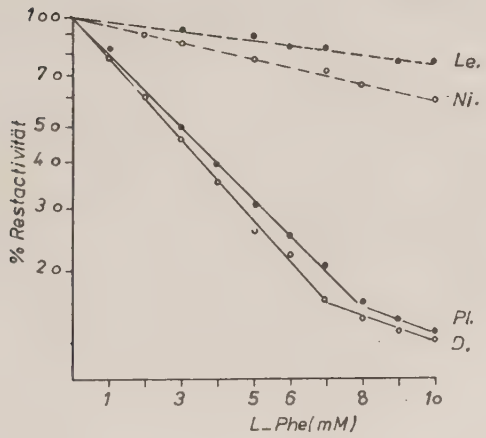


Abb. 42: ALP-Aktivität in Abhängigkeit von der L-Phe Konzentration.

3. Die Wirkung von Harnstoff auf die alkalische Phosphatase:

Es ist bekannt, daß Harnstoff in Konzentrationen unter 4 M bei neutralem pH eine reversible Inaktivierung vieler Enzyme bewirkt. Bei höheren Konzentrationen jedoch werden zunehmend die Wasserstoffbrücken, die für die Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Strukture der Proteine wichtig sind, gespalten, was zu einer völligen Denaturierung führt. Abb. 43 zeigt die Wirkung verschiedener Konzentrationen von Harnstoff auf die ALPs aus Placenta, Dünndarm, Leber, Knochen und Niere.

Placenta-ALP ist relativ stabiler als die übrigen Phosphatasen. Die relative Stabilität gegenüber Harnstoff für diese Phosphatase kann man wie folgend einordnen: Placenta-ALP Dünndarm-ALP Leber-ALP Nieren-ALP Knochen-ALP

Alle Enzyme werden bei 8 M völlig denaturiert.

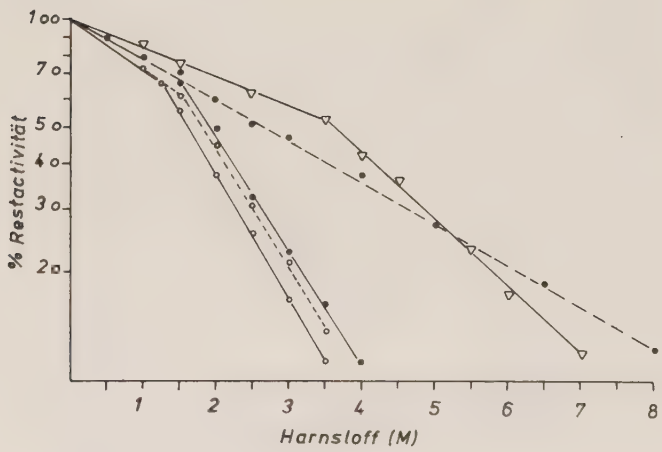


Abb. 43: Inhibierung der ALP-Aktivität durch Harnstoff.

---•---•--- Placenta-ALP
———o——— Knochen-ALP
-----o----- Leber-ALP
——▽—— Dünndarm-ALP
———•——— Nieren-ALP

4. Effekt von EDTA und Metallionen:

Abb. 44 zeigt die Effekte verschiedener EDTA-Konzentrationen auf die ALP-Aktivität aus Placenta, Dünndarm, Niere und Leber in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
Hierbei wurden die Enzym-Präparate mit den jeweiligen EDTA-Konzentrationen inkubiert und nach bestimmten Zeitabständen auf ihre Restaktivitäten getestet. Dabei enthielten die Substrat-Puffer-Lösungen die jeweiligen Konzentrationen an EDTA. Alle ALPs wurden durch 10^{-5} M EDTA innerhalb einer Stunde völlig inaktiviert. Es wurden keine besonderen charakteristischen Unterschiede in Bezug auf ihre Inaktivierung durch diese Chelatisierungsagentien festgestellt, außer daß die Placenta-ALP bei relativ höheren Konzentrationen an EDTA nach bestimmten Zeiten genau soviel inaktiviert wird wie die übrigen alkalischen Phosphatasen bei niedrigeren Konzentrationen.

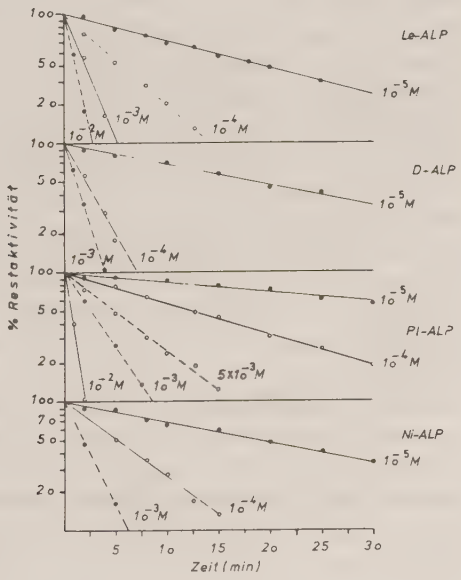


Abb. 44: Reversible Inaktivierung der ALP durch EDTA.

Die Effekte von Metallionen an ALP wurde wie folgend untersucht.
Die ALPs aus Leber, Niere, Dünndarm und Placenta wurden entweder mit EDTA oder in o,o1 M TRIS/HCl Puffer pH 7,4 inkubiert oder gegen o,o5 M EDTA gegen den gleichen Puffer dialysiert. Dann wurden die total inaktivierten ALP-Enzympräparate mehrmals gegen o,o1 M Tris/HCl Puffer pH 7,4 dialysiert und anschließend auf einer Sephadex G-25 Säule chromatographiert, um das EDTA zu entfernen. Zugabe von Mg^{2+} Ionen zu diesen Apoenzymen in Konzentrationen bis auf 1o mM stellte nur ca. 20 % der Originalaktivität wieder her. Bei Zugabe von Zn^{2+} in Konzentration von $1o^{-6}$ M zu diesen teilreaktivierten Enzymen wurde fast die Originalaktivität wiederhergestellt.
Die vier untersuchten alkalischen Phosphatasen zeigten ähnliche Ergebnisse.
Wenn eine Enzymlösung aus Leber, Dünndarm, Placenta oder Niere gegen o,o1 M Tris/HCl pH 7,4 dialysiert und durch Chromatographie über Sephadex G-25 deionisiert wurde, verlieren alle Phosphatase ca. 60 % ihrer ursprünglichen Aktivität. Bei Zugabe von Zn^{2+} in zunehmender Konzentration ab 10^{-7} M wurde die Originalaktivität bei 5×10^{-6} M Zn^{2+} völlig wieder hergestellt, während bei weiterer Zugabe von Zn^{2+} Ionen über $1o^{-5}$ M die Aktivität in zunehmender Weise inhibiert wurde. Auch Mg^{2+} Ionen führen zur reaktivierung des Enzyms bis auf Konzentrationen von 10 mM, jedoch wirken sie wiederum darüberhinaus inhibierend. Andere Metallionen wie Co^{2+}, Ni^{2+}, und Mn^{2+} hatten ähnliche Effekte wie Mg^{2+}, während Ca^{2+} und Cu^{2+} keinen aktivierenden Effekt zeigten.
In der Gegenwart von Mg^{2+} (5mM) in einer Enzymlösung kontte die Zn^{2+} Ionenkonzentration bis auf $1o^{-4}$ M erhöht werden, ohne einen inhibierenden Effekt zu zeigen.
Während die Orthophosphatasewirkung bei $1o^{-5}$ M Zn^{2+} inhibiert wurde, war die Pyrophosphataseaktivität noch voll vorhanden.

5. Kinetische Eigenschaften der alkalischen Phosphatase:

Hier wurden nur die reinen Präparate aus Niere, Leber, Dünndarm und Placenta sowie aus Kälber-Dünndarm verwendet.

Verschiedene Autoren haben K_m-Werte für ihre ALP-Präparate veröffentlicht, die mehr oder weniger gereinigt waren. Ein Vergleich zwischen diesen Werten ist schwierig, da bei unterschiedlichen Testbedingungen gearbeitet wurde. Die hier aufgeführten Untersuchungen hatten den Zweck, festzustellen, ob zwischen den oben genannten ALP's charakteristische Unterschiede bestehen. Diese ALP-Präparate hydrolysieren neben den organischen Phosphorestern auch die organischen Pyrophosphate (ADP, ATP) sowie anorganische Pyrophosphate (NaP_iP_i).
Alle ALP's zeigen sowohl Phosphormonoesterase- als auch Pyrophosphataseaktivität. Diese Eigenschaften sind nicht auf Verunreinigung in den Präparaten zurückzuführen.

Die relativen Geschwindigkeiten der Freisetzung von P_i aus verschiedenen Substraten sind (prozentual auf die PNPP Spaltung (100 %) bezogen) in den folgenden Tabelle zusammengestellt.
Die Messungen wurden bei 3o°C in o,2 M Tris/HCl + 1 mM Mg^{2+} Puffer pH 9.o durchgeführt. Die Bestimmung von freigesetztem P_i erfolgte nach Fiske und Subbarov (114).
Die Substratkonzentration im Test betrug stets 3 mM.

Tabelle 15: Die relative Geschwindigkeit der Freisetzung von P_i aus verschiedenen Substraten durch ALPs.

Enzym	PNPP	AMP	ADP	ATP	PP_i
Dünndarm-ALP	100	75	70	60	40
Placenta-ALP	100	95	72	64	45
Leber-ALP	100	52	22	16	20
Nieren-ALP	100	60	26	18	32
Kälber-Dünndarm-ALP	1oo	85	76	74	50

Alle alkalischen Phosphatase-Isoenzyme hydrolysieren die Monophosphate rascher als die anderen Phosphate. Bei Nieren- und Leber-Phosphatase sind besonders größere Unterschiede zwischen Monophosphorestase und Pyrophosphatase-Aktivität festzustellen.

Die K_m-Werte wurden auch für diese ALP-Enzyme bei 30°C in 2A2MP1/HCl Puffer pH 9,8 in Gegenwart von 1 mM Mg^{2+} gemessen.

Zur Ermittlung der K_m-Werte wurden für jedes Substrat-Konzentration drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 16: Michaeliskonstante (Km) der ALP aus verschiedenen Organen für verschiedene Substrate.

Enzym	Km (mM)			
	PNPP	AMP	ADP	PP_i
Dünndarm-ALP	o.77	4,8	5,6	6,4
Leber-ALP	o,92	4	5,8	17
Placenta-ALP	o,8	6	4	12
Nieren-ALP	1,1	7,5	6,7	21
Kälber-Dünndarm-ALP	o,6	3,2	6,7	5

Diskussion

Da eines der Hauptziele dieser Arbeit war, die Verwandschaft zwischen den alkalischen Phosphatasen aus verschiedenen Organen festzustellen und Möglichkeiten zu untersuchen, sie einzeln oder in Gemischen quantitativ zu bestimmen, war es notwendig, sie in reiner odermöglichst hochgereinigter Form zu isolieren bzw. zu charakterisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Untersuchungen hauptsächlich an den alkalischen Phosphatasen aus Dünndarm, Niere, Placenta, und Leber des Menschen, sowie an den ALP's aus Kälberorganen insbesondere dem Dünndarm durchgeführt. Bereits 1933 (115) fand man, daß die Extraktion der ALP mit den üblichen Techniken, wie z.B.dem Homogenisieren mit Wasser oder Puffer, schwierig war. Verschiedene Arten der Proteolyse wie kontrollierte Autolyse und Verdauung mit Trypsin sind nur teilweise wirksam (116; 117). Seit 1954 (118) ist die Mortonsche-Butanol Methode die Basis der meisten Extraktionsverfahren. Behandlung mit n-Butanol setzt die membrangebundenen ALP-Enzyme quantitativ frei. Der auf diese Weise erhaltene Rohextrakt kann dann einer fraktionierten Fällung mit Ammoniumsulfat und Aceton unterworfen werden. Zur weiteren Reinigung des Enzyms wurden Ionenaustauscher-Chromatographie und Gelfiltration angewendet. Durch die Anwendung dieser Methoden wurden zwar hochgereinigte Präparate gewonnen, jedoch zeigen sie alle eine gewisse enzymatische Heterogenität, d.h. jedes ALP-Präparat enthält mehrere ALP-Formen, was durch Elektrophorese in verschiedenen Medien nachweisbar ist. Diese Heterogenität der Enzympräparate stellt eine entscheidende Schwierigkeit in der Analyse der Eigenschaften und Strukturen dar.
Uns interessierte vor allem neben der Feststellung und Charakterisierung dieser Hererogenität innerhalb eines Gewebes oder Organs, die einzelnen Formen voneinander zu trennen und so zumindestens die hauptaktive Form als ein reines und enzymatisch einheitliches Protein zu gewinnen.

Für diesen Zweck war die präparative isoelektrische Fokussierung eine sehr nützliche Technik. Hochgereinigte ALP-Präparate aus jedem Organ wurden mit ihrer Hilfe in mehrere Enzymformen aufgetrennt. Andere Techniken wie die präparative PAAG-Elektrophorese und die hydrophobe Chromatographie an Sepharose mit geeigneten Spacern erwiesen sich als effektive Reinigungstechniken, jedoch wurde damit keine Auftrennung der multiplen Formen bzw. der Isoenzyme der ALP's erzielt. Dies kann auf die sehr ähnliche Proteinstruktur der einzelnen Enzymformen innerhalb eines bestimmten Organextrakts zurückzuführen sein. Isotachophoretische Auftrennung der ALP in PAA-Gelen führt dagegen zu recht guten Ergebnissen und kann wie die präparative IEF zur Isolierung der Enzymformen verwendet werden.
Verschiedene Autoren bezifferten die Molekulargewichte für ALP verschiedenen Ursprungs auf 7o ooo bis über 24o ooo. Folgende Tabelle faßt die berichteten ALP's aus verschiedenen menschlichen und tierischen Organen zusammen:

Placenta-ALP(118)	Placenta-ALP(119)	Placenta-ALP(43)	Leber-ALP(120)	Leber-ALP(121)	Leber-ALP(122)
240 ooo 69 ooo	116 ooo	125 ooo	222 ooo	28o ooo	19o ooo

Leber-ALP (Schwein)(56)	Dünndarm-ALP (120)	Dünndarm-ALP (Kalb)(55)	Niere-ALP(123)	Niere-ALP (Schwein) (54)
172 ooo	195 ooo.	14o ooo	17o ooo	155 ooo

Siehe auch Tabelle 11.

Ghosh und Fishman (118) fanden, daß die Placenta-ALP in zwei Formen A und B mit MG's von 69 ooo und 240 ooo vor-

liegt. Doch schien Form A mit dem MG 69 ooo nicht mit dem ALP-Monomeren von Sussman und Gottlieb (119) übereinzustimmen, das ein MG von 58 ooo besitzen sollte. 1974 veröffentlichten Doellgast und Fishman (99) ein MG von 79 ooo für die Placenta-ALP Untereinheit. Wachsmuth und Hiwada (75) fanden, daß die ALP aus Schweinenieren ein tetrameres Glykoprotein ist mit einem MG von 35 ooo - 43 ooo für jede Untereinheit. Nach Ramasamy und Butterworth (124) besitzt dasselbe Enzym allerdings ein MG von 185 ooo und besteht aus zwei identischen Untereinheiten. Auch Fosset et al. (55) zeigten, daß ALP aus Kälberdünndarm aus zwei Untereinheiten von gleichem MG (69 ooo) besteht. Für Schweineleber-ALP gaben Cathala und Brunel (56) ein MG von 172 ooo an; diese ALP besteht aus zwei Untereinheiten mit einem MG von je 67 ooo. In der vorliegenden Arbeit wurde eindeutig festgestellt, daß die ALP aus Placenta, Dünndarm, Leber und Niere je aus zwei sehr ähnlichen oder identischen Untereinheiten besteht. Die relativ hohen MG-Werte, die durch Gelfiltration an Sephadex G-200 bestimmt wurden, können auf den hohen Gehalt der ALP's an Kohlenhydraten zurückzuführen sein. In der Tat ist das Effluent-Volumen (V_e) bei der Gelfiltration nicht so sehr vom MG als vielmehr von der Gestalt und Größe der Moleküle abhängig. Das Spektrum der Molekülgestalt von Proteinen reicht von geometrisch nicht zuordnungsfähigen Formen bis zu Kugelformen (125). Ein beispielweise rotationsellipsoides Molekül benötigt bei der Diffusion im Vergleich zu einem gleichvolumigen Partikel größere Poren, d.h. es wird auf der Säule wesentlich schneller wandern als ein kugelförmiges Molekül. Demnach muß diese Methode für Proteine gleicher MG's aber unterschiedlicher Form zu verschiedenen MG-Werten führen. Andrews (106) zeigte, daß innerhalb einer makromolekularen Gruppe Größe und MG in einem engen Zusammenhang stehen. Derselbe Autor zeigte auch, daß Proteine mit einem großen Gehalt an Kohlenhydraten im Gegensatz zu kohlenhydratfreien Proteinen ausgestreckt vorliegen. Nach dem von Andrews eingesetzten Quotienten kann das durch diese Methode bestimmte MG mit den nach anderen

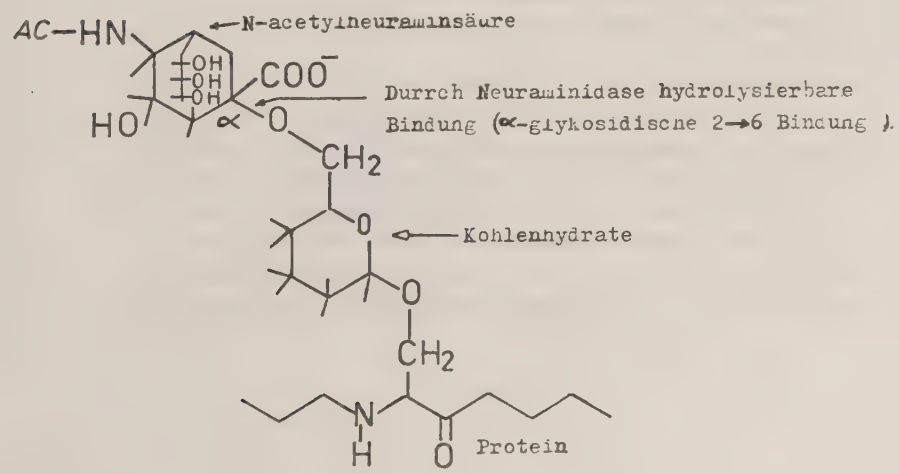
Methoden ermittelten verglichen werden. So berechnet sich für Dünndarm-ALP, für die über Gelfiltration ein MG von 2oo ooo bestimmt wurde, ein Wert von 17o ooo. Die meisten ALP-Isoenzyme sind Sialoglykoproteine. Die über eine ganze Länge der Proteinmoleküle verteilte negative Ladung dieser Säuren führt aufgrund elektrostatischer Abstoßungskräfte zu einer gestreckten Molekülform und bewirkt so eine erhebliche Hydratisierung des Makromoleküls (126).
Die verschiedenen ALP-Formen innerhalb eines Organextraktes haben jedoch das gleiche MG.
Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit der ALP's auf verschiedenen Trägermedien müssen auf Unterschieden in der nach außen auftretenden Gesamtladung der betreffenden Enzymmoleküle beruhen. Damit wären den Isoenzymen bzw. multiplen Formen unterschiedliche pI's zuzuschreiben. Tatsächlich konnten durch die Elektrofokussierungsmethode im pH-Gradienten mehrere Enzymformen aufgetrennt bzw. isoliert werden. Alle ALP-Präparate aus den verschiedenen Organen waren bei der Elektrophorese auf verschiedenen Trägermedien uneinheitlich und führten zu für die jeweiligen Organe charakteristischen Bandenmustern. Damit ergibt sich die Frage, ob es sich bei diesen Phosphatasen aus den einzelnen Organen um a) unterschiedliche Primärstrukturen oder b) postsynthetisch abgeänderte Formen des Ursprungsenzyms handelt. Im ersten Fall lägen echte Isoenzyme vor d.h. genetisch codierte, unterschiedliche Primärstrukturen. Der zweite Fall könnte durch eine der in der Einleitung angeführten Ursachen einer postsynthetischen Modifikation des Ursprungsproteins eingetreten sein. Vor allem in diesem Fall kann es sich um unterschiedliche Kohlenhydrate- bzw. Neuraminsäure-Gehalte handeln. Wenn die native Konformation eines Proteins durch irgendeinen Faktor geändert wurde, kann eine gewisse Anzahl von dissozierbaren Gruppen, die vorher im Inneren der Proteinstruktur vergraben waren, an die Oberfläche des Moleküls gelangen und damit die Nettoladung des Moleküls beeinflussen. Diese Gruppen müssen in diesem Fall die Nettoladung des Proteins im Bereich seines

isoelektrischen Punktes beeinflussen.
Unter den IEF-Bedingungen wurde für Concavalin stets die Entstehung von mehreren Konformationen mit unterschiedlichen pI's gefunden (127). Artefakte konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Jedoch muß zwischen vermeidbaren und nicht vermeidbaren Faktoren, die zu solchen Artefakten führen, unterschieden werden. Vermeidbare Faktoren können z.B. die Wärmeentwicklung während der Elektrophorese, unvollständige Fokussierung usw. sein. Nicht vermeidbare Artefakte können durch die Träger-Ampholine selbst verursacht werden; es kann zu Wechselwirkungen zwischen den Ampholinen und den Proteinen kommen. Außerdem sind bestimmte Proteine bei den pH's, bei denen sie fokussiert wurden (d.h. bei ihren pI's) nicht stabil. Das kann dann zu der Heterogenität des Proteins führen.
Da die ALP's im pH-Bereich von 3,8 - 1o,8 unter den Fokussierungsbedingungen stabil sind, kann der zuletzt genannte Faktor jedoch ausgeschlossen werden. Eine Wechselwirkung der ALP's mit den Ampholin ist jedoch möglich, da die ALP's ja metallhaltige Glykoproteine sind. Ampholine sind Polycarboxyl-polyaminosäuren, die als Chelatbildner fungieren können. Für die ALP-Präparate konnte jedoch ein solche Wechselwirkung mit den Ampholinen als Ursache ihrer Heterogenität ausgeschlossen werden. Nach Vorinkubation der reinisolierten ALP-Isoenzyme mit den Ampholinen erhält man in der IEFPG immer nur eine einzige Bande bzw. bei der Sialinsäure enthaltenden Phosphatase stets dasselbe Bandenmuster in reproduzierbar definierter Position. Viele Proteine, die sich mit den üblichen Techniken (wie Sedimentation, Elektrophorese und Immunologie) als einheitliche Proteine darstellen, wurden im IEFPG in mehrere Komponenten aufgetrennt. Die Frage, ob diese Heterogenität die natürlichen Verhältnisse in der Zelle wiedergibt oder durch Modifikation oder Degradation der Proteine während des Isolierungsprozesses auftrat, ist nicht einfach zu beantworten. Jedenfalls ist die durch diese Technik aufgezeigte Heterogenität mehr auf die Trenneffektivität dieser Methode als auf

auf strukturelle oder Ladungsunterschiede im Proteinpräparat selbst oder die Entstehung von Artefakten zurückzuführen. Nur in sehr wenigen Fällen war die Heterogenität auf eine der IEF-Methode inherente Eigenschaft zurückzuführen. Die hohe Auftrennungseffektivität dieser Technik veranlaßt viele Wissenschaftler, ihre Kriterien für Proteinhomogenität zu revidieren. Hefe-Aldolase z.B. wurde mit dieser Technik in drei Banden aufgetrennt. Dieses Muster wurde auf eine "random"-Kombination von zwei verschiedenen Untereinheiten zu Dimeren zurückgeführt. (128). Andere Enzyme zeigten Heterogenität, die nicht auf die Strukturen ihrer Untereinheiten zurückzuführen sind; z.B. sind bei Hefe-Enolase, die in der PAA-Gel Elektrophorese in ein schwache und zwei starke Proteinbanden aufgetrennt wurde, im IEFPG mindestens 7 Banden nachzuweisen.
Die Heterogenität und ihre Ursachen sind jedoch je nach Organ unterschiedlich zu erklären: Bei der Darm-Phosphatase stellen die drei Formen des Enzyms sehr wahrscheinlich ein- und dasselbe Protein dar, dessen verschiedene Formen durch Punkt-Mutationen des Ursprungsproteins unterschiedliche Ladung erhalten haben. Es besteht nämlich die Möglichkeit, daß eine beträchtliche strukturelle Modifikation von Enzymen mit geringer Spezifität stattfindet, die nicht entscheidend wichtig für Stoffwechselprozesse sind, ohne ihre katalytischen Eigenschaften so zu verändern, daß ihre Mutanten dem Selektionsdruck unterwerfen werden.
Angenommen, daß die Heterogenität in den ALP-Präparaten nicht auf Artefakte zurückzuführen ist, so erklärt sie sich jedoch je nach Organ unterschiedlich. Da die Dünndarm-ALP gegen die Wirkung von Neuraminidase resistent war, kann eine Heterogenität aufgrund unterschiedlichen Gehaltes an Neuraminsäure ausgeschlossen werden. Daß es sich bei der Darm-Phosphatase nicht um echte Isoenzyme handelt, ließ sich durch die gleichen biochemischen und sehr ähnlichen physikalischen Eigenschaften feststellen (siehe auch immunologische Eigenschaften). Aus der Tatsache, daß Dünndarm-ALP aus zwei Untereinheiten besteht, kann daher ge-

schlossen werden, daß diese Untereinheiten ähnlich sind und als Form A bzw. A' vorliegen. So entstehen die drei Formen durch die Bildung von Dimeren AA, A'A' und AA'. Hierbei muß auch wieder angenommen werden, daß eine der beiden Untereinheiten als Hauptanteil vorliegt, so daß die unterschiedlichen Anteile der drei Formen erklärt werden können. In den übrigen alkalischen Phosphatasen erklärt sich die Frage der Heterogenität zum Teil oder hauptsächlich aufgrund unterschiedlichen Gehaltes an Sialinsäure (Neuraminsäure-Reste im Glykoprotein). Die ALP's sind Glykoproteine, d.h. Polysaccharid-Ketten von variabler Länge und aus unterschiedlichen Zucker-Molekülen bestehend, die durch die reduzierenden Enden der Kette kovalent an das Protein gebunden sind. In diesen Glykoproteinen besitzt die Sialinsäure eine terminale Position und ist mit dem Protein durch Oligosaccharid-Ketten verbunden (126). Die Sialinsäure ist dabei mit Galaktose, N-Acetylgalaktosamin oder N-Acetylglucosamin durch eine 2 - 6 oder 2 - 3 Bindung glycosidisch verbunden. Zwei Bindungstypen zwischen Kohlenhydraten und Proteinen sind in Glykoproteinen bekannt.

1) N-Glykosidische Bindung zwischen den Aminogruppen von Asparagin und C-1 von N-Acetylglucosamin,
2) O-glycosidische Bindung mit der Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threonin-Restes. Folgende Zeichnung zeigt eine solche Struktur: (129)



Robson und Harris (130) berichteten über die Existenz von sechs Phänotypen der alkalischen Phosphatase aus der Placenta. Dies wurde durch Stärkegel-Elektrophorese bei pH 8,6 festgestellt. Wie vorher in den Ergebnissen beschrieben wurde, sind mindestens 7 enzymatisch aktive Banden durch IEFPG der Placenta-ALP nachzuweisen. Nun ergibt sich die Frage, ob jede dieser Banden in sich eine unabhängige Identität repräsentiert, ob sie genetisch determiniert sind oder ob sich einige von ihnen nur durch ihren unterschiedlichen Gehalt an Sialinsäure oder Kohlehydraten unterscheiden. In der Einleitung wurde die molekulare Heterogenität der Proteine auch auf die unterschiedliche Addition von Kohlehydraten oder Sialinsäure postsynthetisch d.h. nach der genetischen Synthese der Protein-Polypeptidkette an diese Proteine zurückgeführt. Um die Möglichkeit einer durch unterschiedlichen Gehalt an Sialinsäure verursachten Heterogenität festzustellen, wurde durch extensive Behandlung eines bestimmten Placenta-ALP Präparates mit Neuraminidase alle Sialinsäure abgespalten. Extensive Behandlung mit Neuraminidase ist sehr wichtig, da eine nur partielle Entfernung von Sialinsäure-Resten zu einem völlig anderen Bandenmuster in der IEFPG führt. Das entstandene Bandenmuster in der IEFPG kann wie folgt charakterisiert werden:

1) reduzierte elektrophoretische Mobilität,
2) einige Banden verschwinden,
3) stets nur 4 Banden unterschiedlicher Intensität sind nachzuweisen.

Die Heterogenität des ALP-Präparates der Placenta, auch nach der Entfernung von Sialinsäure-Resten, besagt, daß dieses Enzym tatsächlich in unterschiedlichen Formen vorliegt, die entweder die gleiche Primärstruktur, aber unterschiedlichen Gehalt an Kohlehydraten haben, oder unterschiedliche Primärstrukturen mit einem gewissen genetisch determinierten Unterschied in der Aminosäure-Sequenz an bestimmten Abschnitten der Polypeptidkette besitzen. Da durch

SDS-Elektrophorese dieses Enzyms festgestellt wurde, daß es aus zwei Untereinheiten besteht, kann angenommen werden, daß die Placenta-ALP ein dimeres Enzym ist, das aus einer Untereinheit A besteht, die dann durch Punkt-Mutation zu A', A' und A''' differenzierte. Diese Formen können dann wiederum verschiedene Mengen Sialinsäure enthalten.

Die Nieren-Phosphatase tritt in zwei Isoenzymformen auf. Das Haupt-Enzym (ca. 90 % der Gesamtaktivität) ist nierenspezifisch und kommt in vielen multiplen Formen vor, die sich nur durch ihren Sialinsäuregehalt unterscheiden. Die andere Enzymform ist dem dünndarmspezifischen Isoenzym zuzuschreiben, da sie die gleichen biochemischen und immunologischen (siehe Teil II) Eigenschaften hat, obwohl ihr MG etwas kleiner ist als das der Dünndarm-ALP. (siehe unter Faeces-ALP-Kapitel III). Die Frage besteht, ob beide Isoenzyme dieselbe intrazelluläre Verteilung in Nieren-Geweben haben oder jede nur in bestimmten Geweben vorkommt, z.B. die eine im tubulären und die andere im glomulären Gewebe. Sie kann durch Anwendung immunologischer Techniken mit Hilfe von spezifischen Antiseren beantwortet werden, zumal beide Isoenzyme membrangebunden sind.

Die Heterogenität der Leber-Phosphatase kann wiederum auf dem unterschiedlichen Gehalt an Sialinsäure bzw. Kohlehydraten beruhen. Die elektrophoretische Mobilität der ALP aus Knochen, Milz, Herz, Gehirn und Pankreas wurde durch Neuraminidase-Behandlung stark reduziert, was auf ihre Sialoglykoprotein-Natur hinweist.

Es gibt drei enzymatische Eigenschaften, in denen sich die alkalischen Phosphatasen aus verschiedenen Organen, wenn auch nur wenig unterscheiden:

1) relative Geschwindigkeit der Hydrolyse verschiedener Substrate
2) Michaeliskonstante
3) Reaktion mit bestimmten Inhibitoren.

Auch drei physikalische Eigenschaften sind verschieden:

1) Elektrophoretische Mobilität auf verschiedenen Trägermedien,
2) Neuraminidase-Suszeptibilität,
3) Hitze- und Harnstoff-Labilität. Aufgrund dieser Unterschiede können die in dieser Arbeit untersuchten alkalischen Phosphatasen unterschiedlicher Herkunft in drei Hauptgruppen eingeteilt werden:

1) intestinale,
2) placentale
3) die übrigen Phosphatasen wie z.B. Leber-, Knochen-, und Nieren-ALP's.

Die physiko- und biochemischen Unterschiede dieser Isoenzyme erlauben zum Teil die Differenzierung der einzelnen ALP's. Die Placenta-ALP ist hier am genauesten innerhalb dieser Isoenzym-Gruppen zu differenzieren, insbesondere aufgrund ihrer Hitzestabilität und Harnstoff-Suszeptibilität.
Die Dünndarm-ALP ist besonders durch ihre Nichtbeeinflussung durch Neuraminidase elektrophoretisch deutlich von den übrigen ALP's zu unterscheiden. Ihre physikalischen Eigenschaften nehmen eine Stellung zwischen beiden Gruppen ein, wenn auch mehr Ähnlichkeit zur Placenta-ALP besteht.

Auf solche Unterschiede haben auch frühere Arbeiten hingewiesen. Quantitative Verfahren wurden veröffentlicht, die hauptsächlich auf den Eigenschaften Hitzestabilität sowie Harnstoff-Effek5 und Inhibierung durch L-Phe beruhen. (131; 132).
Eine automatisierte Methode wurde auch aufgrund der unterschiedlichen Denaturierung durch Harnstoff entwickelt (131). Diese Methoden fanden jedoch keine besondere Resonanz in der klinischen Anwendung. Ein sehr genaue Kontrolle der Temperatur während der Inkubationszeit ist notwendig, um reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse zu erzielen. Obwohl es möglich ist, die Placenta-ALP und Dünndarm-ALP von den übrigen ALP's zu unterscheiden, ist eine gut reproduzierbare und quantitative Unterscheidung wegen der kleinen Diffe-

renzen zwischen den Leber-, Knochen- und Nieren-ALP's schwierig (133).
Die qualitative bzw. quantitative Bestimmung und Differenzierung der ALP's im menschlichen Serum in normalem und pathologischem Zustand ist von großer Bedeutung. Eine quantitative Bestimmungsmethode kann in der klinischen Anwendung nur von Interesse sein, wenn sie genau, schnell, leicht durchzuführen und zuverlässig ist.
Daher wurden hier die immunologischen Eigenschaften dieser Isoenzyme untersucht, um die Möglichkeit ihrer quantitativen Differenzierung durch Immuntitration mit den jeweiligen monospezifischen Antiseren zu prüfen. Dies erschien erfolgsversprechend, da diese immunologischen Methoden zur quantitativen Bestimmung anderer Enzyme im Serum klinische Bedeutung erlangt haben (134).

TEIL II

Immunoenzymologische Ergebnisse .

Diskussion .

A. Gewinnung und allgemeine Eigenschaften des Kaninchen-Anti-ALP-Serums:

Antikörper sind Proteine, die sich in der Globulin-Fraktion des Blutserums befinden und werden in Vertebraten als Antwort auf die Existenz eines Antigens, d.h. einer Substanz, die als Fremdkörper von Empfängertier erkannt wird, produziert. Die Antikörper haben die Eigenschaft, das Antigen, das ihre Produktion stimuliert hat, spezifisch zu binden. Solche Spezifität kann mit der Enzym-Spezifität verglichen werden. Diese Fähigkeit der Antikörper, zwischen den homologen Antigenen und denvielen anderen Substanzen verschiedener Strukturen spezifisch zu unterscheiden, ist von fundamentaler Bedeutung für ihre Anwendung in der analytischen Immunologie. Mit gegen Enzyme gerichteten Antikörpern (Immunoenzymologie) ist es möglich, die Evolutionsdivergenz von Enzymen (135,136), die antigenische Verwandtschaft der Enzyme aus verschiedenen tierischen Spezies (137) und Bakterien (138), die fötale Entwicklung von Enzymen (139), die genetische Basis der multiplen Formen von Enzymen (140), und die intrazelluläre Lokalisierung von Enzymen (141) zu untersuchen.
In dieser Arbeit wurden ausschließlich Kaninchen für die Gewinnung von Antiseren gegen ALP's verwendet. Ein bis zwei mg Enzym (bzw. 1 bis 2 fache ALP-Einheiten, die der höchsten spezifischen Aktivität der jeweiligen ALP entsprechen) wurden zur Immunisierung bei jeder Injektion verwendet.
Die alkalischen Phosphatasen aus Dünndarm, Placenta, Leber und Niere des Menschen sowie aus dem Dünndarm von Kälb und Schwein wurden, wie unter Methoden beschrieben ist, innerhalb einer Zeitperiode von 3o bis 9o Wochen jeweils in zwei Kaninchen injiziert. Der Titer der gewonnenen Antiseren bei jeder Blutentnahme wurde bestimmt und ist für Kälber- und menschliche Dünndarm-ALP gegen die Immunisierungsdauer in Abb. 45 aufgetragen.

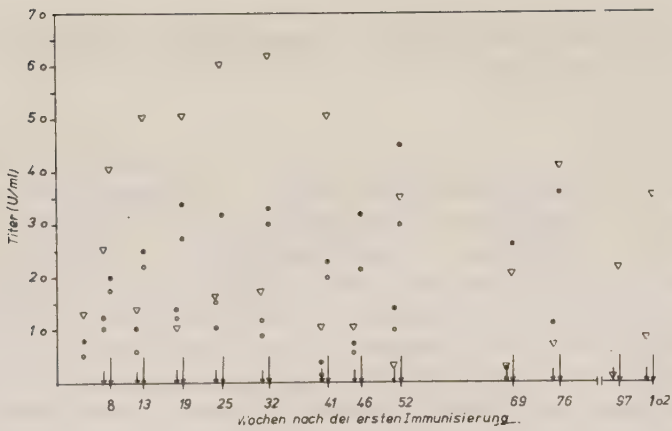


Abb. 45: Zeitliche Variation der Titer der Antiseren beim Kaninchen-Anti-ALP-Serum

• : Kaninchen, das mit D-ALP(M) immunisiert wurde.

o : Kaninchen, das mit D-ALP(M) immunisiert wurde.

▽ : Kaninchen, das mit D-ALP(K) immunisiert wurde.

Kurzer Pfeil: Intravenöse Injektion;

längerer Pfeil: Blutentnahme

Der Titer eines Antiserums ist hier definiert als die Enzym-Einheiten, die durch 1 ml Antiserum als Ag-Ak präzipitiert werden. Der Titer nimmt langsam nach der primären Injektion und schnell nach der ersten intravenösen Boosterung zu, danach nimmt er langsam ab, wie es zu erwarten ist. Weitere Boosterung nach der zweiten intravenösen Injektion führte nicht zu einer merklichen Erhöhung des Titers als der unmittelbar nach der zweiten Boosterung erreichte Titer. Wenn eine Periode von mehr als 6 Wochen nach der letzten Booster-Injektion vergeht, ohne daß die Tiere immunisiert wurden, sank der Titer stark ab, jedoch bei einer weiteren Booster-Injektion nimmt er wieder zu.

Die Spezifität der gewonnenen Antiseren bei allen Tieren war während des ganzen Immunisierungsprogramms konstant. Nur im Falle des Antiserums gegen Kälber Dünndarm-ALP wurde festgestellt, daß die späteren (aviden) Antiseren (nach der vierten Blutentnahme) eine besonders hohe Affinität zu den heterologen Antigenen von Dünndarm des Schweines und des Menschens besaßen. Die Ag-Ak Präzipitationsbanden bei der Immunodiffusion in den Agarosegelen waren stärker ausgeprägt. Die früheren und späteren Antiseren präzipitierten im Immunotitrations-Test quantitativ diese Antigene. Es wurde auf keinen Fall eine immunologische Reaktion mit den heterologen Antigenen, die von Anfang an nicht mit den jeweiligen Antiseren reagiert haben, festgestellt. Eine solche Reaktion kann aber durchaus vorkommen, da je länger das Immunisierungsprogramm läuft, desto mehr determinante Gruppen werden in der Antigen-Struktur vom Tier erkannt bzw. Antikörpermoleküle dagegen erzeugt. Solche Determinanten im heterologen Antigen, die nicht genug den homologen Determinanten ähneln, um mit den früheren Antiseren zu reagieren, werden jedoch mit den späteren (mehr aviden) Antiseren reagieren.

Es ist daher wichtig, bevor man endgültige vergleichende immunoenzymologische Schlüsse ziehen kann, erst festzustellen, ob die Spezifität eines bestimmten Antiserums konstant bleibt. Die hier vorliegenden Ergebnisse sind hauptsächlich mit den gepoolten Antiseren ab der dritten Blutentnahme gewonnen worden.

Es wurde keine immunologische Reaktion der alkalischen Phosphatasen mit den Normalseren der Kaninchen festgestellt.

B. Eigenschaften der Antigen (ALP-Antikörper (Anti-ALP Serum) Reaktion :

Manche Enzyme werden durch die Reaktion mit ihren Antikörpern inhibiert oder teilinhibiert, andere werden nicht inhibiert. Beim Immunotitrations-Test können daher folgende Möglichkeiten als Indikatoren für den Verlauf der Ag-Ak Reaktion dienen:
1. Inhibierung der enzymatischen Aktivität
2. Präzipitierung der gebildeten aktiven Ag-Ak Komplexe.
Bei allen untersuchten ALP's wurde ein enzymatisch aktiver und präzipitierbarer Ag-Ak Komplex gebildet. In früheren Arbeiten (142, 143) über die alkalische Phosphatase wurde berichtet, daß erst nach Zugabe von Anti (Burro oder Shaf) γ-Globulin der gebildete Ag-Ak Komplex präzipitiert werden kann. Im Falle von Antiseren gegen die menschliche Nieren-ALP wurde hier ein plötzlicher aber langsam zunehmender Anstieg an ALP-Aktivität im Überstand im Überschußbereich direkt nach dem Neutralizationspunkt gefunden.
Es wurde berichtet (144), daß die Zugabe von Polyäthylenglykol (Carbowachs; MG = 6000) zu der Agarose bei der Immunolelektrophorese, zu besseren und deutlicher ausgeprägten Präzipitat-Bögen führt. Daher wurde hier auch der Effekt des wasserlöslichen PÄG auf die Präzipitation von Ag-Ak Komplexen im wäßrigen Medium untersucht. Hierbei wurden ca. 300 mU ALP mit dem jeweiligen homologen Antiserum inkubiert und dazu PÄG in der Endkonzentration von 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 8 ; 10 ; 15 ; 20 ; und 40 % zugegeben. Parallel dazu wurde Normal-Kaninchen-Serum anstelle der Antiseren verwendet.
Nach 24 Stunden Inkubation wurde die Restaktivität im Überstand nach Abzentrifugation bestimmt. Daraus wurde festgestellt, daß eine PÄG-Endkonzentration über 5 % eine in zunehmender Weise unspezifische Präzipitierung verursacht.
Eine unter 5 % liegende PÄG-Konzentration (2-3%) bewirkt eine völlige spezifische Präzipitierung der gebildeten Ag-Ak Komplexe. Nicht nur diese Eigenschaft führte zur Anwendung der PÄG im Immunotitrations-Test, sondern auch die für die völlige Präzipitierung der Ag-Ak Komplexe nötige Zeit. Ohne die Zugabe von PÄG ist normalerweise eine Inkubationszeit von ca. 24 Stun-

den notwendig. Abb. 46 zeigt den zeitlichen Verlauf der Immunopräzipitation bei verschiedenen Antikörper-Mengen zu einer bestimmten ALP-Aktivität (hier D-ALP(M)).

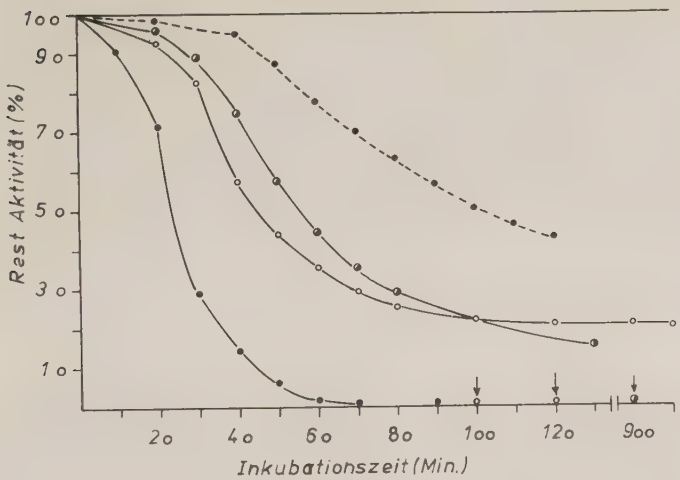


Abb. 46: Immunopräzipitation von o,3 U D-ALP (M) durch ihr homologes Antiserum beim Vorhandensein von 2,5 % PÄG in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

———•——— + o,1 ml (1:1o v/v) verdünntes Antiserum

———o——— + o,o5 ml (1:10 v/v) verdünntes Antiserum

———⊘——— + o,1 ml (1:10 v/v) verdünntes Antiserum aber in der Abwesenheit von PÄG

-------•-------- + o,o5 ml (1:10 v/v) verdünntes Antiserum ohne Zusatz von PÄG.

- Pfeile zeigen die unspezifische Präzipitierung bei der nachträglichen Erhöhung der PÄG-Konzentration auf 10 %.

C. 1. Immunochemische Eigenschaften der alkalischen Phosphatase aus menschlichem Dünndarm:

Zur Immunisierung wurden zwei Präparate verwendet: Ein hochgereinigtes Präparat, daß nur aus der Hauptform mit dem pI von 4,3 besteht. Beide Kaninchen-Antiseren, die gegen diese Antigene erzeugt wurden, präzipitierten quantitativ die Dünndarm-ALP sowohl im Rohextrakt als auch die rein isolierten multiplen Formen. Der Verlauf der Immunotitrations-Kurven ist identisch bei allen multiplen Formen der Dünndarm-ALP. Abb. 47 zeigt die Immunotitrat der Dünndarm-ALP sowie die ALP's aus anderen Organen mit dem Anti-Dünndarm-ALP-Serum

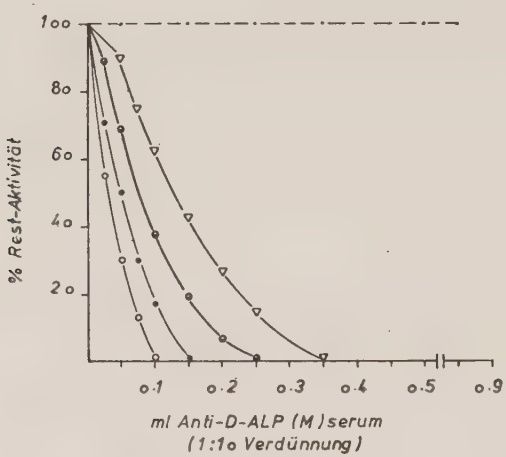


Abb. 47: Immunotitration des Anti-Dünndarm-ALP(M)-Serums
mit: Dünndarm-ALP(M) ———o———;
Dünndarm-ALP des Kalbes ———•———;
Placenta-ALP(M) ———▽———;
Dünndarm-ALP des Schweines ———o———;
Andere ALP's aus Leber, Knochen, Milz, Niere (Hauptform), Lunge, Magen, Gehirn, Gallenflüssigkeit und Erythrozyten des Menschen. --------•--------

Die Immunotitration wurde durch die Zugabe zunehmender Mengen verdünnten Antiserums zu 3oo mU von jeder Organ-ALP ausgeführt.
Die Restaktivität ist als Prozentsatz der Kontrolle nach Inkubation und Zentrifugation dargestellt.
Ausführliche Versuchsdurchführung. Siehe Methoden.

Die enzymatische Heterogenität der Dünndarm-ALP im angereicherten Rohextrakt kann auch durch Immunodiffusion sowie Immunoelektrophorese im Agarosegel nachgewiesen werden. Abb. 48 zeigt eine zweidimensionale IE eines Dünndarm-ALP-Präparates, wobei die immunologische Identität von den elektrophoretisch unterschiedlichen multiplen Formen der D-ALP deutlich durch die Verschmelzung der absteigenden Präzipitatbögen zu erkennen ist. Das Nichterscheinen der zu erwartenden dritten Präzipitatlinie kann durch einen der beiden Präzipitatbögen maskiert werden.

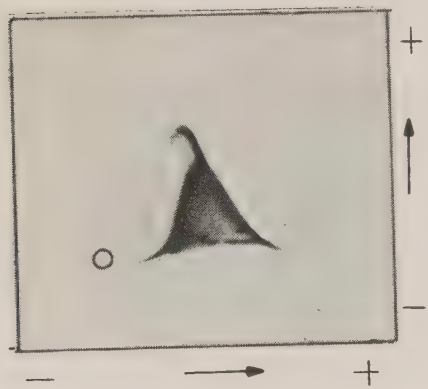


Abb. 48: Zweidimensionale Immunoelektrophorese der Dünndarm-ALP des Menschen (das angereicherte Präparat). Antigen: 1 U D-ALP(M). Antiserum: 1 ml anti-D-ALP(M) Serum./1oo ml Agarose. Erste Dimension: 6o Min., 2o V/cm 5°C, in 1 % Agarose in Barbital Puffer pH 8,6, Ionenstärke o,o6, zweite Dimension: über Nacht (14 h), 8 V/cm, 5°C. Enzymfärbung: siehe Methoden.

Abb. 49 zeigt eine zweidimensionale IE der rein isolierten Hauptform der D-ALP. Die Erscheinung eines einzigen Präzipitatbogens beweist die Homogenität dieses Präparates, wie es auch durch andere Techniken festgestellt wurde.

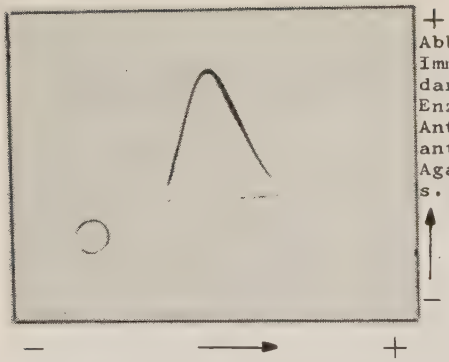


Abb. 49: Zweidimensionale Immunoelektrophorese der Dünndarm-ALP des Menschen (Haupt-Enzymform mit dem pI von 4,3. Antigen: o,8 U, Antiserum 1 ml anti-D-ALP(M)-Serum/1oo ml Agarose. Andere Bedingungen: s. Abb.48.

Die immunologische Verwandtschaft der Dünndarm-ALP zu den übrigen Organ-ALP's wurde durch verschiedene immunologische Techniken untersucht. Durch den Immunotitrationstest wurden die ALP's aus menschlicher Placenta sowie aus Kälber- und Schweine-Dünndarm durch das Anti-Dünndarm-ALP(M) Serum quantitativ präzipitiert (Abb. 47). Die Immunodiffusionsversuche zeigen jedoch eine Kreuzreaktion mit Spornbildung an den Berührungspunkten der Präzipitatbanden der Ag-Ak Komplexe.

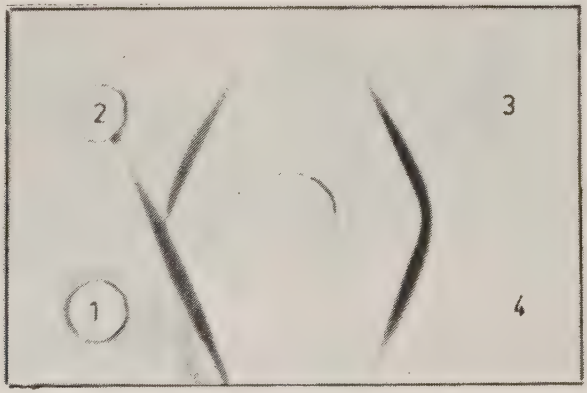


Abb. 50: Immunodiffusion nach Ouchterlony gegen anti-Dünndarm-ALP (M)-Serum.
Zentral Depot: Anti-D-ALP(M)-Serum
Periphere Depots: 1. D-ALP (M) - (p^I = 4.3)
2. Pl-ALP(M)

3. D-ALP (M)-Enzymform mit pI von 4.3
4. D-ALP (M)-Enzymform mit pl von 4.8

Diese Eigenschaften, nämlich totale Präzipitierung und die Kreuzreaktionen, weisen darauf hin, daß nur eine gewisse Anzahl von Determinanten in der Protein-Struktur dieser ALP's ähnlich oder identisch sind. Aus dem Verlauf der Immunotitrationskurven kann geschlossen werden, daß die Affinität der ALP aus dem Kälber-Dünndarm zum Anti-D-ALP(M) Serum relativ größer als die für die Placenta-ALP ist.
Keine immunochemischen Reaktionen wurden festgestellt zwischen dem Anti-D-ALP (M)Serum und der alkalischen Phosphatase aus folgenden Organen: Leber, Knochen, Niere (Haupt-Form), Herz, Milz, Pankreas, Lunge, Magen, Gallenflüssigkeit und Gehirn des Menschen.

C. 2. Immunochemische Eigenschaften des Anti-Placenta-ALP Serums:

Sowohl das Antiserum gegen die hochgereinigte Placenta-ALP mit allen multiplen Formen als auch das gegen die durch IEF isolierte Fraktion II mit dem pI von 5-2, haben die ALP in Placenta-Homogenaten und die beiden getrennten Enzym-Fraktionen quantitativ präzipitiert.

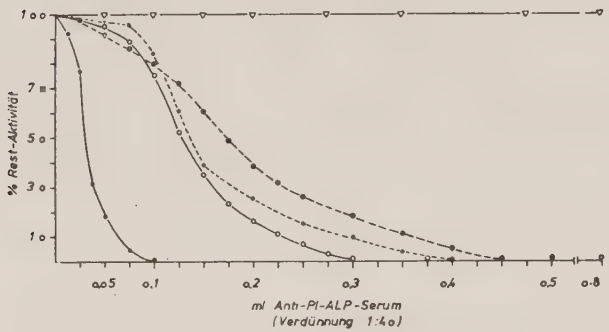


Abb. 51: Immunotitration des Anti-Placenta-ALP(M)-Serums mit:
Placenta-ALP des Menschen ——●——
Dünndarm-ALP des Menschen ——○——
Dünndarm-ALP des Kalbes ----●----
Dünndarm-ALP des Schweines ----●----
Andere ALP's aus Leber, Knochen, Niere (Hauptenzymform) Milz, Lunge, Pankreas, Gallenflüssigkeit, Gehirn, Herz, Magen und Erythrozyten des Menschen. ——▽——
Test-Bedingungen wie Abb. 47.

Auf Immunodiffusionsplatten wurde nur ein einziger starker Ag-Ak Präzipitatbanden gebildet. Die Präzipitatbanden der verschiedenen Pl-ALP Fraktionen bilden miteinander keinen

Sporn, sondern verschmelzen miteinander, was auf die Identität ihrer Determinanten hinweist (Abb. 54 B). Auch in der zweidimensionalen IE in Agarosegelen der beiden isolierten Fraktionen bzw. des teilweise angereicherten Pl-ALP-Präparates wurden zwei Präzipitatbögen gebildet, die auf die Existenz von 2 Enzym-Formen bzw. 2 Gruppen von multiplen Formen hinweisen, die sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit unterscheiden, aber immunologisch identisch sind.

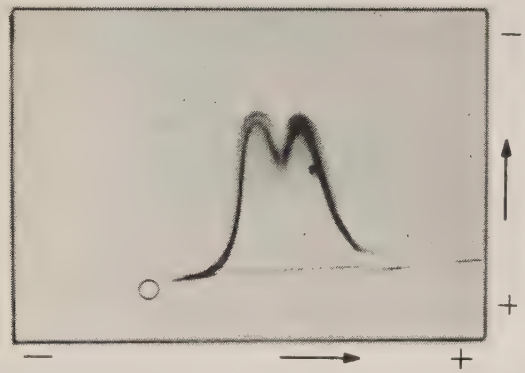


Abb. 52: Zweidimensionale Immunoelektrophorese nach Laurell
Antigen: 2,5 U, Pl-Alp(M)
Antiserum: o,4 ml Anti-pl-ALP(M)-Serum/1oo ml Agarose.
Andere Bedingungen wie Abb. 48.

Immunologische Verwandtschaft der ALP aus der Placenta des Menschen zu den übrigen Organ-ALP's:
Das Anti-Pl-ALP(M)Serum präzipitiert quantitativ die alkalische Phosphatase aus folgenden Organen: Dünndarm des Menschen, Kälber- und Schweine-Dünndarm. Erstaunlicherweise wurde die ALP aus der Kuh-Placenta weder von dem Anti-Pl-ALP-Serum noch von einem der in dieser Arbeit verwendeten Antiseren präzipitiert.
Dieses Antiserum reagiert auch auf keine Weise mit ALP's aus folgenden Organen des Menschen: Leber, Knochen, Niere (Hauptenzym-Form)Milz, Magen, Lunge, Pankreas, Gehirn, Herz und Gallen-Flüssigkeit. Im Immunodiffusionstest und in der Immunoelektrophorese bilden die alkalischen Phosphatasen aus der Placenta und dem Dünndarm des Menschen mit dem Anti-

Pl-ALP-Serum starke Präzipitatbögen mit Spornbildung an deren Kontaktpunkten, was auf deren partielle Identität bzw. auf das Vorhandensein von organspezifischen Determinanten hinweist (Abb. 53 & 54).

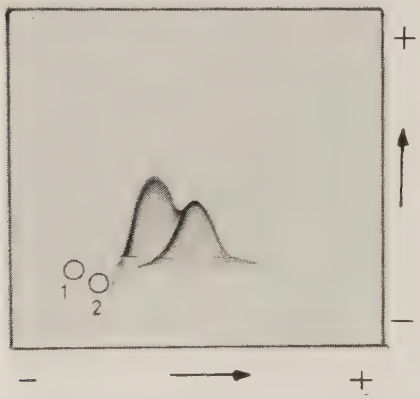


Abb. 53: Zweidimensionale Immunoelektrophorese nach Laurell

Antigene: Depot 1 : 1 U D-ALP(M) - Hauptenzymform mit pI 4,3.
Depot 2: 1 U Pl-ALP(M)-Enzym-Fraktion mit pI 4,4

Antiserum: 1 ml anti-Pl-ALP(M)-Serum/1oo ml (1 % w/v) Agarose

Die Versuchsbedingungen sind wie in Abb. 48.

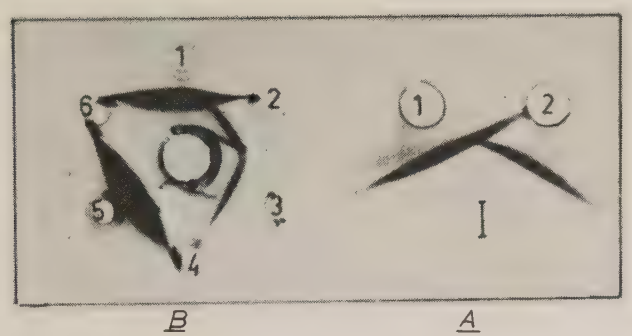


Abb. 54: Doppeldiffusion nach Ouchterlony. Das Zentraldepot I enthält anti-Pl-ALP(M)-Serum
Periphere Depots: A. 1 : Pl-ALP(M) 2,5 U.
A. 2 : D-ALP (M) 2,0 U.
B. 1 & 5 : Pl -ALP (M)
B. 2 & 3 : D - ALP (M)

Obwohl die ALP aus Kälber- und Schweine-Dünndarm durch das Anti-Pl-ALP-Serum quantitativ als Ag-Ak Komplexe präzipitiert wurden, zeigten sie auf Immunodiffusionsplatten je eine relativ wenig deutliche Präzipitatbande (Abb. 55), die aber auch die partielle Identität dieser ALP's mit der Placenta-ALP zeigt.
Auf Immunoelektrophorese-Platten wurde diese Präzipitation deutlicher, wenn PÄG in der Endkonzentration von ca. 5 % (w/v) im Agarosegel vorhanden war.
Diese partielle Identität weist wiederum auf das Vorhandensein von Spezies - spezifischen Determinanten in der ALP hin.
Es wurden keine Unterschiede in den immunologischen Eigenschaften der durch Neuraminidase behandelten Pl-ALP gegenüber der nicht behandelten Pl-ALP festgestellt.

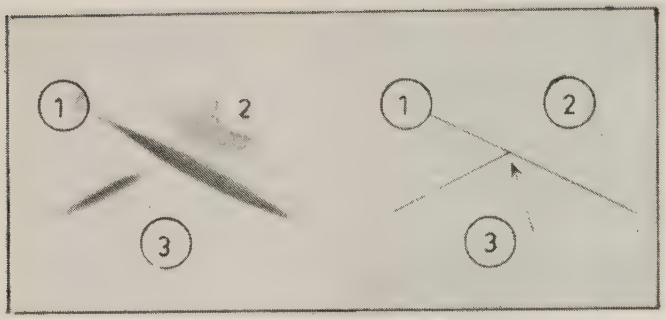


Abb. 55: Doppeldiffusion nach Ouchterlony gegen anti-Pl-ALP-(M)-Serum.
Depot 1: Dünndarm-ALP des Kalbes 2,5 U.
Depot 2: Placenta-ALP des Menschen 2,5 U.
Depot 3: Anti-Pl-ALP(M)-Serum

Mit den anderen beiden Antiseren (auch nach Anreicherung und Konzentrierung) wurden garkeine Immunoreaktionen mit den ALP's aus dem Dünndarm und der Placenta festgestellt.

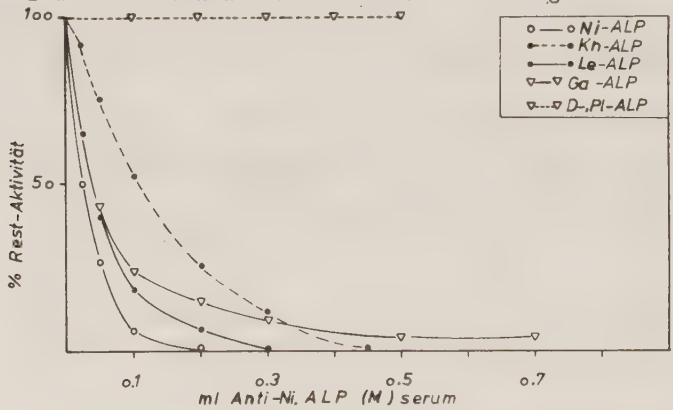


Abb. 56: Immunotitration des anti-Nieren-ALP(M)-Serums mit:
Nieren-ALP (Hauptenzym Form) ———o———
Knochen-ALP ---------•----------
Le-ALP ———•———
Gallenflüssigkeit-ALP ———▽———
Dünndarm- und Placenta-ALP ---------▽----------
Testbedingungen wie unter Abb. 47

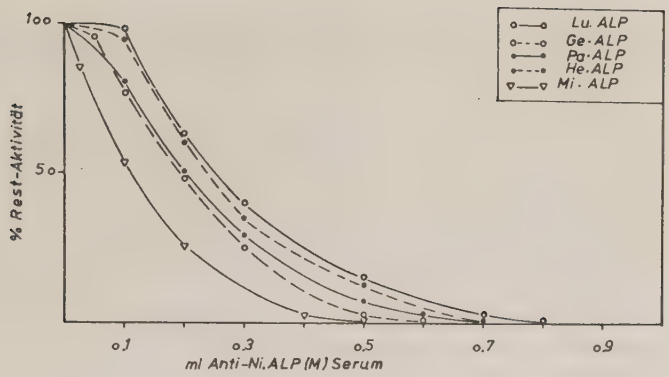


Abb. 57: Immunotitration des anti-Nieren-ALP(M)-Serums mit:
Lunge-ALP ——o—— ; Gehirn-ALP - - - - o - - - - -
Pankreas-ALP —•— ; Herz-ALP - - - - • - - - - -
Milz-ALP —▽—

Testbedingungen wie unter Abb. 47

C.3. Immunochemische Eigenschaften des Anti-Nieren-ALP-Serums:

Drei Nieren-ALP-Präparate mit verschiedenen Reinigungsgraden wurden zur Immunisierung verwendet.

1. Das nach dem Sephadex G-200 Reinigungsschritt hochgereinigte Präparat (mit allen multiplen Formen).
2. Fraktion II mit einem PI von 5.2, die durch einen IEF-Reinigungsschritt isoliert wurde.
3. Die nach Neuraminidase-Behandlung aufgetrennte Haupt-Enzymform (Sialinsäure-freie-Ni-ALP).

Die Antiseren gegen jedes der beiden ersten Präparate waren das Produkt eines gepoolten Antiserums aus 4-malien Blutentnahmen, entsprechend dem durchgeführten Immunisierungsprogramm (Abb. 45). Das Antiserum gegen die Sialinsäure-freie-Ni-ALP war ein Produkt von zwei Blutentnahmen.

Immunotitrations-Untersuchungen : Die in Abb. 56 und Abb. 57 gezeigten Titrationskurven wurden durch die Anwendung des Antieserums gegen die Fraktion II (der Ni-ALP mit dem pI von 5.2) durchgeführt. Dieses Antiserum präzipitiert quantitativ die ALP's aus folgenden Organen : Niere (Hauptenzym-Form), Leber, Knochen, Milz, Gallen-Flüssigkeit, Herz, Gehirn, Pankreas, Lunge, Magen, sowie die Erythrozyten-ALP.

Es wurde keine Reaktion mit den ALP's aus Dünndarm und Placenta des Menschen sowie aus Kälber- und Schweine-Dünndarm fest gestellt. Dieses Antiserum präzipitierte jedoch die ALP's aus folgenden Kälber-Organen: Niere, Leber, Milz, Pankreas, und Herz. Die übrigen Organe wurden nicht untersucht.

Das Antiserum gegen das angereicherte Nieren-ALP-Präparat, das alle multiplen Formen dieses Enzymes enthält, zeigte ähnliche immunologische Eigenschaften wie das Antiserum gegen Fraktion II. Jedoch wenn dieses Antiserum teilweise gereinigt und danach konzentriert wurde, konnte eine Zunahme seiner Fähigkeit, die Dünndarm-ALP zu präzipitieren, festgestellt werden.

Diese Resultate zeigen, daß die zur Immunisierung verwendete Ni-ALP (angereichertes Präparat) einen kleinen Anteil von einem Enzym enthält, das identische oder ähnliche Determinanten hat

wie die in der Dünndarm-ALP. Die Konzentration bzw. die Affinität dieser entsprechenden Antikörper-Moleküle ist so gering, daß im Bereich der verwendeten Antiserum-Konzentrationen im Immuntitrations-Test kein Präzipitierungseffekt festgestellt werden konnte.
Die durch die präparativen IEF isolierte Enzym-Fraktion mit dem pI von 4,3 (10 % der gesamten Ni-ALP-Aktivität im angereicherten Präparat) wurde quantitativ durch das Anti-Dünndarm-ALP-Serum präzipitiert und zeigte eine völlige immunologische Identität mit der Dünndarm-ALP. Bei der Immunodiffusion in Agarosegelen gegen Anti Ni-ALP-Serum bildete jede durch dieses Antiserum präzipitierbare Organ-ALP eine starke Ag-Ak Präzipitatbande, die jeweils mit der Präzipitatbande der Ni-ALP als auch mit jeder der übrigen Organ-ALP's am Berührungspunkt ohne Spornbildung ineinander verschmolz, was auf das Fehlen von spezifischen Determinanten in diesen betreffenden Organen hinweist.

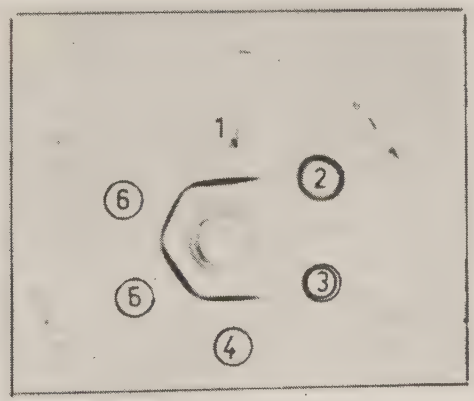


Abb. 58: Nachweis der immunologischen Identität der Nieren-ALP und ALP's aus Leber, Knochen und Milz des Menschen im Ouchterlony Doppeldiffusionstest Zentraldepot: Anti-Ni-ALP(M)-Serum, periphere Depots: 1. Ni-ALP, 2. Pl-ALP 3. D-ALP 4. Knochen-ALP 5. Milz-ALP 6. Leber-ALP

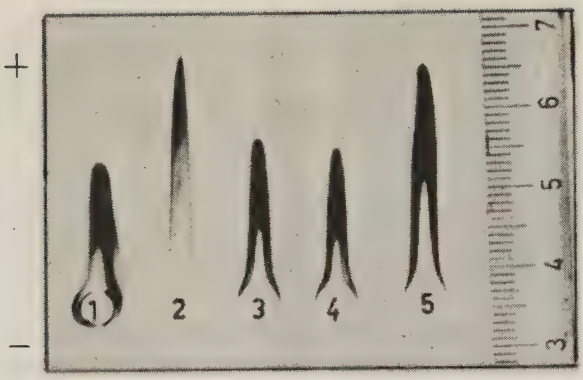


Abb. 59: Eindimensionale Immunoelektrophorese gegen anti-Ni-ALP(M)-Serum.

Antiserum: o,8 ml Antiserum/1oo ml (1% w/v) Agarose.

Antigene: Depot 1. Ni-ALP, 2. Le-ALP, 3. Milz-ALP
4. Herz-ALP, 5. Knochen-ALP

Tris/Barbital/Blycin Puffer, pH 8,8., Elektrophorese: 1o h, bei 5°C, Enzymspezifische Anfärbung.

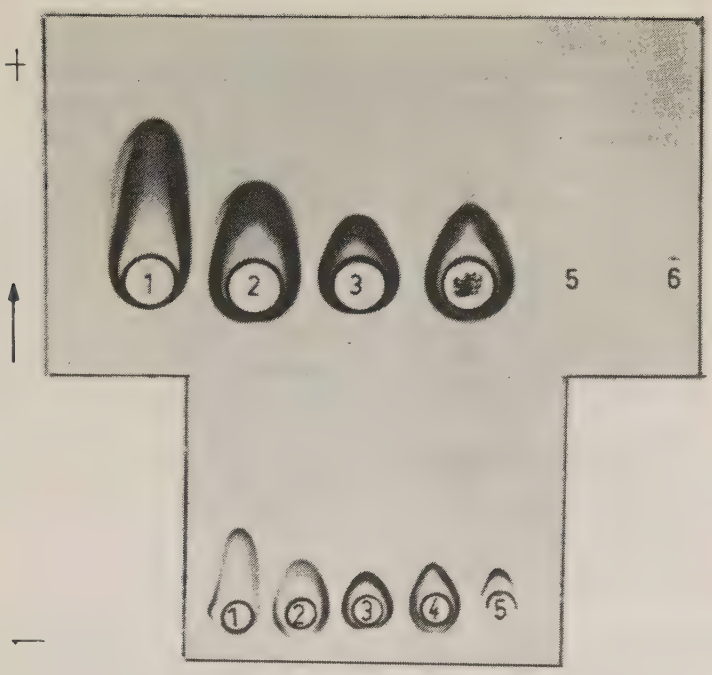


Abb. 60: Eindimensionale Immunoelektrophorese gegen Anti-Ni-ALP(M)-Serum.

A: Anti-Ni-ALP(M)-Serum (gegen das Sialinsäure freie hauptenzymform). 1 ml Antiserum/1oo ml (1 % w/v) Agarose.

Antigene: Depot 1. Ni-ALP 2. Le-ALP
3. Milz-ALP 4. Pankreas-ALP
6. Dünndarm-ALP 5. Pl-ALP

B: Anti-Ni-ALP(M)-Serum (nach Anreicherung des gegen das angereicherte Ni-ALP-Präparat erzeugte Antiserum)
o,6 ml Antiserum/1oo ml Agarose (1 % w/v).

Antigene: Depot 1. Ni-ALP 2. Knochen-ALP
3. Le-ALP 4. Milz-ALP
5. Dünndarm-ALP (angereichertes Präparat)

Barbital Puffer pH 8,6, Elektrophorese: 1o h, bei 5°C. Enzymspezifische Anfärbung (s. Methoden).

Alkalische Phosphatasen aus Kälber Organen, die durch das Anti-Ni-ALP-Serum quantitativ präzipitiert wurden, zeigten jedoch im Immunodiffusionstest gegen das gleiche Antiserum Präzipitatbanden, die auf eine partielle Identität mit der Nieren-ALP bzw. auf die Existenz von Spezies-spezifischen Determinanten diesen ALP's hindeuten.

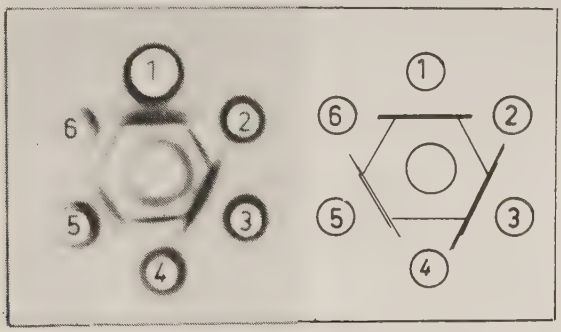


Abb. 61: Ouchterlony-Doppeldiffusion gegen das Anti-Ni-ALP(M)-Serum. Nachweis der partiellen immunologischen Identität der Ni-ALP des Menschen und die ALP's aus Kälber-Organe: Zentraldepot: Anti-Ni-ALP(M)-Serum; periphere Depots:
1. Ni-ALP(M) 2. Ni-ALP(Kalb) 3. Leber-ALP(M)
4. Le-ALP(Kalb) 5. Ni-ALP(M) 6. Milz-ALP (K).

Die immunologischen Eigenschaften der Sialinsäure freien Ni-ALP (Hauptfraktion)-hiermit ist gemeint, die Sialinsäure-Reste, die durch Neuraminidase-Behandlung abgespalten werden konnten), sind genau die gleichen wie die multiplen Formen der Ni-ALP, die nicht durch Neuraminidase behandelt worden waren. Abb.62 zeigt eine Immunodiffusions-Platte mit dem Antiserum gegen Sialinsäure-freie Ni-ALP. Dies deutet darauf hin, daß die Sialinsäure-Reste im ALP (Glykoprotein) keinen Einfluß auf die Spezifität bzw. Eigenschaften der gebildeten Antikörper gegen die Ni-ALP haben.

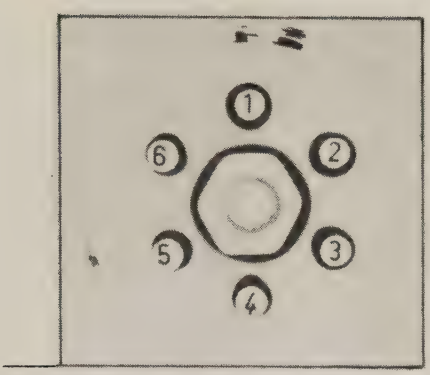


Abb. 62: Ouchterlony Doppeldiffusion gegen Anti-Ni-ALP(M)-Serum. Nachweis der immunologischen Identität der multiplen Formen von Nieren-ALP.
Zentraldepot: Antiserum gegen die Sialinsäure freie Ni-ALP.
periphere Depots: 1 & 4 Ni-ALP (angereichertes Präparat) 2 & 3 Sialinsäure freie Ni-ALP
5. Ni-ALP (Fraktion II nach(IEF))
6. Ni-ALP (Fraktion III nach(IEF))

C. 4. Immunochemische Eigenschaften des Anti-Leber-ALP-Serums:

Antiseren gegen die hochgereinigte Le-ALP (Sephadex G-200 Reinigungsschritt) sowie gegen die Fraktion II mit einem pI von 4.2 wurden im Kaninchen erzeugt.

Immunotitrationsexperimente:

Eine quantitative Präzipitierung der Leber-ALP wurde durch die beiden Antiseren erzielt.

Alkalische Phosphatase aus folgenden Organen des Menschen: Niere (Hauptenzym-Form), Knochen, Herz, Gallen-Flüssigkeit, Milz, Lunge, Magen, Gehirn und Pankreas wurden durch das Anti-Le-ALP-Serum quantitativ präzipitiert. Dieses Antiserum zeigte keine immunochemische Reaktion mit der ALP aus Placenta und Dünndarm des Menschen sowie ALP aus Dünndarm des Kalbes und Schweines.

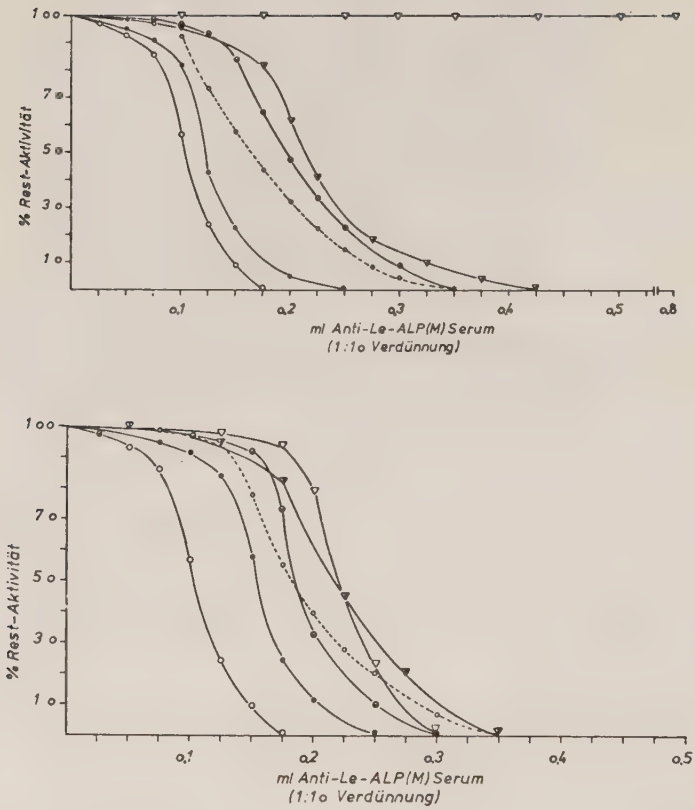


Abb. 63 A: Immunotitration des anti-Leber-ALP(M)-Serums mit:

- Leber-ALP
- Gallenflüssigkeit-ALP
- Nieren-ALP
- Milz-ALP
- Knochen-ALP
- Placenta-,Dünndarm-ALP

B: Immunotitration des Anti-Leber(M)-Serums mit:

- Leber-ALP
- Herz-ALP
- Lunge-ALP
- Pankreas-ALP
- Gehirn-ALP
- Magen-ALP

Testbedingungen wie unter Abb. 47

Im zweidimensionalen Immunoelektrophorese-Test bildete ein angereichertes Le-ALP-Präparat mit ihren Antiseren zwei Präzipitatbögen, die auf die Identität der Determinanten in beiden Enzym-Formen hinweisen.

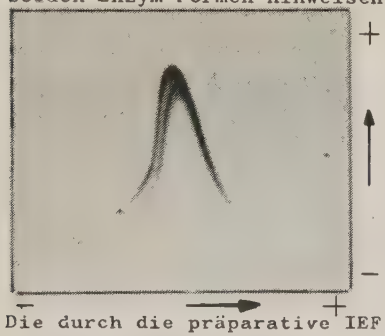


Abb. 64: Zweidimensionale Immunoelektrophorese nach Laurell.
Antiserum: 2 ml anti-Le-ALP(M)-Serum/1oo ml Agarose (1% w/v).
Antigen: 2,4 U Le-ALP(M).
Die Versuchsbedingungen wie unter Abb. 48 (s. auch Methoden)

Die durch die präparative IEF isolierten 4 Enzymformen zeigten im Immunodiffusions-Test völlige immunologische Identität.

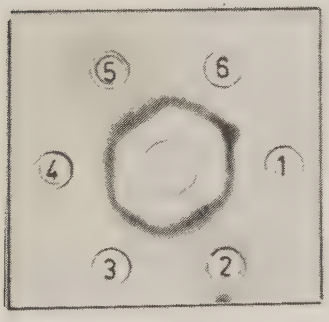


Abb. 65: Doppeldiffusion gegen Anti-Le-ALP(M)-Serum. Nachweis der immunologischen Identität der durch präparative IEF isolierten Leber-ALP Fraktionen.
Zentraldepot: anti-Le-ALP(M)-Serum Periphere Depots:
1. Fraktion I (pI=3.9),
2. Fraktion II(pI = 4.2)
3. Fraktion III (pI = 4.9)
4. Fraktion IV (pI = 5.3)
5. Le-ALP (vor IEF),
6. Fraktion II (pI = 4.2)

Im Immunodiffusions-Test gegen Anti-Le-ALP-Serum zeigten die ALP's, die im Immuntitrationstest durch dieses Antiserum quantitativ präzipitiert wurden, gegenüber der Leber-ALP als auch gegeneinander völlige immunologische Identität.

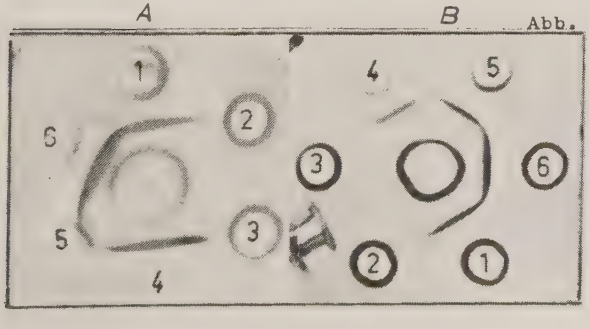


Abb. 66: Doppeldiffusion nach Ouchterlony gegen anti-Leber-ALP-(M)-Serum.
Zentraldepot: Anti-Le-(ALP)-Serum. Periphere Depots:A: 1.Le-ALP, 2. D-ALP, 3. P1-ALP, 4. Milz-ALP 5. Kn-ALP, 6, Ni-ALP.B: 1. Le-ALP, 2. D-ALP, 3. P1-ALP, 4.Pankreas-ALP, 5.Ni-ALP, 6. Galle-ALP.

C. 5. Immunochemische Eigenschaften des Kaninchen-Antiserums gegen alkalische Phosphatase aus Kälber- und Schweine-Dünndarm:

Diese immunologischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um hauptsächlich die Möglichkeit zu untersuchen, ob Antiserum gegen die Dünndarm-Phosphatase tierischer Herkunft die gleichen immunologischen Eigenschaften wie die aus dem menschlichen Dünndarm hat. Damit wäre die Schwierigkeit vermeidbar, Antigene aus menschlichen Organen zu gewinnen bzw. Antikörper gegen sie zu erzeugen. Antiserum wurde gegen das hochgereinigte Präparat (Sephadex-G-200 Reinigungsschritt) und die rein isolierte Form mit dem pI von 4.4 gewonnen.
Immunotitration des Anti-D-ALP(K)Serums mit den verschiedenen ALP's zeigte, daß sowohl ALP aus Menschen- als auch aus Kälber- und Schweine-Dünndarm sowie aus menschlicher Placenta quantitativ präzipitiert wurden. Mit den übrigen Organ-ALP's wurde keine immunochemische Reaktion festgestellt.

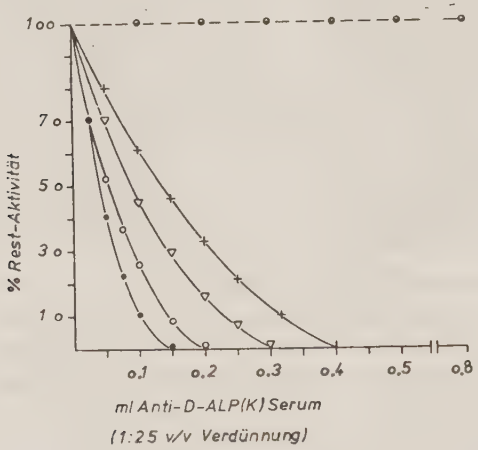


Abb. 67: Immunotitration des anti-Dünndarm-ALP(Kalb)-Serums mit:
Dünndarm-ALP des Kalbes ——●——
Dünndarm-ALP des Schweines ——○——
Dünndarm-ALP des Menschen ——▽——
Placenta-ALP des Menschen ——+——
Niere-, Leber-, Milz-, Pankreas-, Herz-ALP des Kalbes und des Menschen ----●----

Im Immunodiffusions-Test zeigten jedoch die alkalischen Phosphatasen aus Schweine-Dünndarm und aus dem Dünndarm und der Placenta des Menschen je eine Präzipitatbande unterschiedliche Stärke und bildeten miteinander je einen Sporn, was auf die partielle Identität dieser Antigene hinweist.

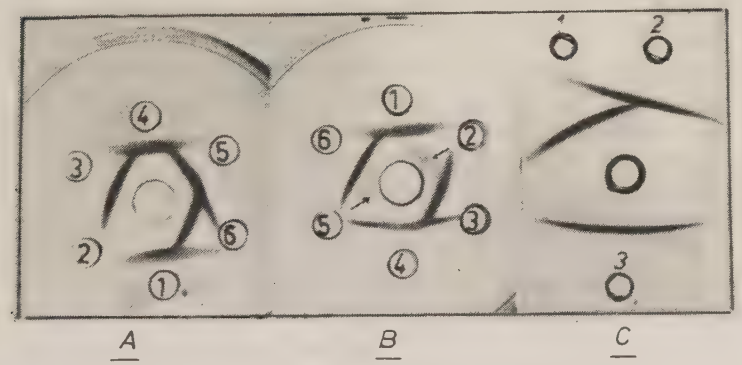


Abb. 68: Doppeldiffusion nach Ouchterlony gegen Anti-Dünndarm-ALP (Kalb)-Serum. Nachweis der partiellen immunologischen Identität der Dünndarm-ALP des Kalbes mit: Dünndarm-ALP des Schweines, Dünndarm-ALP des Menschen Placenta-ALP des Menschen und ALP aus dem Faeces des Menschen.

A: Zentraldepot: anti-Dünndarm-ALP(K)-Serum

periphere Depots: 1. D-ALP(K)
2. Le-ALP (M),
3. D-ALP (M),
4. D-ALP (K),
5. D-ALP(S),
6. D-ALP(M)

B: Zentraldepot: anti-Dünndarm-ALP(K)-Serum (aus den ersten und zweiten Blutentnahmen).
periphere Depots: 1. D-ALP(K),
2. Pl-ALP(M),
3. Feaces-ALP(M),
4. D-ALP (S)
5. Pl-ALP(M),
6. D-ALP (S)

C: Zentral-Depot: anti-Dünndarm-ALP(K)-Serum (aus der Blutentnahme nach 1o2 Wochen s. Abb. 45
periphere Depots: 1. Pl-ALP(M),
2. D-ALP (S)
3. D-ALP (M)

Antiserum gegen Schweine-Dünndarm-ALP präzipiert quantitativ die alkalischen Phosphatasen aus dem Dünndarm und der Placenta des Menschen sowie aus dem Kälber-Dünndarm. Abb.69.

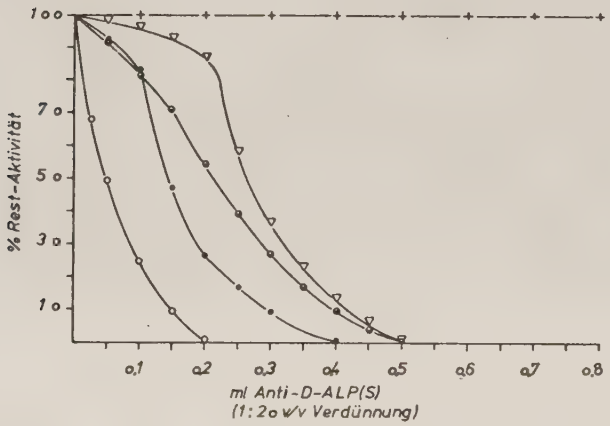


Abb. 69: Immunotitration des Anti-Dünndarm-ALP(Schwein)-Serums mit:

Dünndarm-ALP des Schweines ——○——
Dünndarm-ALP des Kalbes ——●——
Dünndarm-ALP des Menschen ——⊙——
Placenta-ALP des Menschen ——▽——
Leber-, Niere-, Knochen-, Herz-, Milz-, Pankreas-, und Lunge-ALP des Menschen ——+——

D. Immunoabsorptions-Versuche:

Die aufgrund der immunologischen Untersuchungen gezeigte partielle Identität zwischen den alkalischen Phosphatasen aus der Placenta und dem Dünndarm ist auf das Vorhandensein von gemeinsamen, aber auch Organ-spezifischen Dererminanten in beiden Proteinmolekülen zurüc kzuführen. Da das Antiserum aus einer Vielzahl von Antikörpermolekülen gegen jede Determinante besteht, kann durch Immunoabsorption ein spezifisches Antiserum für diese partiell identischen Isoenzyme hergestellt werden. Durch die Immunotitrations-Versuche kann die Menge an Antiserum, die zur quantitativen Präzipitierung einer bestimmten ALP-Konzentration nötig ist, ermittelt werden. Bei den Immunoabsorptionsversuchen wurde 1.5 bis 2 facher Überschuß dieses ermittelten Wertes an Antigen zu dem heterologen Antiserum gegeben.
Die Immunabsorption erfolgte auch durch Chromatographie des betreffenden Antiserums auf Säulen mit an aktivierte Sepharose gebundenem heterologen Antigen.
Durch die gegenseitige Immunoabsorption von Placenta- und Dünndarm-ALP mit ihren heterologen Antiseren wurde jeweils ein monospezifisches Antiserum gewonnen. Dieses Antiserum zeigte weder im Immunotitrations-Test noch in der Immunodiffusion- oder in den Immunoeliktrophore-Versuchen eine Kreuzreaktion (Abb. 70).

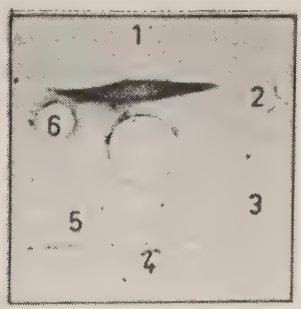


Abb. 70 : Doppeldiffusion nach Ouchterlony gegen monospezifisches Anti-Dünndarm-ALP(M)-Serum.
Antigene im peripheren Depots:
1. Dünndarm-ALP(M) (Haupt-Komponente); 2. Placenta-ALP(M) 3. Leber-ALP(M) ; 4. Knochen-ALP(M) ; 5. Nieren-ALP(M)-Hauptenzym-Form ; 6. Gehirn-ALP(M) ; Zentraldepot: Monospezifisches anti-D-ALP(M)-Serum.

Ihre Titer jedoch betrugen nur noch ein Drittel der Original-Werte. Diese können wieder auf die Normal-Werte erhöht werden (s. Methoden).
Die gegenseitige Immunoabsorption der Placenta-ALP und der alkalischen Phosphatase aus Kälber-Dünndarm mit ihren heterologen Antiseren führte zu einem monospezifischen Antiserum gegenüber den jeweiligen Antigenen.

Das durch Immunoabsorption gewonnene Anti-D-ALP(K)-Serum kann noch die alkalische Phosphatase aus menschlichem Dünndarm quantitativ und spezifisch präzipitieren.
Damit ist die Annahme bestätigt, daß monospezifische Antiseren zur spezifischen Quantifizierung der ALP's aus menschlichem Dünndarm, aus Antiseren, die gegen tierische Antigene erzeugt wurden, verwendet werden können.
Die Immunoabsorption von Anti-Ni-ALP(M)-Serum durch Leber-ALP(M) und umgekehrt führte zur totalen Inaktivierung des betreffenden Antiserum gegenüber den beiden Antigenen.
Die Immunoabsorption von beiden Antiseren durch Knochen-ALP führte auch zur Entstehung eines Serums, das nicht mehr mit den homologen Antigenen reagieren kann.
Aus den hier vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß die alkalischen Phosphatasen aufgrund ihrer Antigenität in drei Gruppen eingeteilt werden kann: Dünndarm-ALP; Placenta-ALP und ALP's aus den übrigen Organen, die jeweils spezifisch und quantitativ durch ihre jeweiligen spezifischen Antiseren differenziert werden können.

E. Quantitative Bestimmung der alkalischen Phosphatasen in künstlichen Gemischen:

Eine grundlegende Voraussetzung zur quantitativen Bestimmung von Isoenzymen durch die Immunotitrations-Methode ist die Gewinnung immunospezifischer Antiseren gegen jedes dieser Isoenzyme. Die quantitative Bestimmung der Isoenzyme der ALP wurde an künstlichen Gemischen bekannter Isoenzym-Zusammensetzung überprüft. Tabelle 17 zeigt, daß die theoretischen Werte mit guter Reproduzierbarkeit experimentell erreicht werden. Die Variations-Koeffizienten der ermittelten Werte lagen zwischen 1,6 bis 4,2 %.

Tabelle 17: Quantitative Bestimmung der Isoenzyme der alkalischen Phosphatase in künstlichen Gemischen:
A: Immunologisch ermittelte Werte in %
B: Theoretische Werte

	I		II		III		IV		V	
Enzym	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
D-ALP	35	35	11	12	80	78	48	49	oo	oo
Pl-ALP	43	42	71	70	o9	11	36	36	12	11
Le-ALP*	22	23	18	18	11	11	16	15	88	89

* Oder ALP aus Niere, Knochen.

F. Diskussion

Das Interesse an der alkalischen Phosphatase wurde durch die Beobachtung stimuliert, daß die ALP-Aktivität im menschlichen Serum unter bestimmten pathologischen Bedingungen, die die Leber, Knochen und andere Organe umfassen, zunimmt. Daher war das Ziel der meisten Arbeiten über die ALP, die Entwicklung eines klinischen Labor-Tests zu ermöglichen der die Differentialdiagnose von Gewebeentzündungen, die die Ursache für eine erhöhte Serum-ALP sind, zuläßt.
Es ist bekannt, daß Organe wie Knochen, Leber, Placenta, Niere und Dünndarm zum ALP-Aktivitätsspiegel im Serum individuell oder zusammen beitragen. Um die Herkunftsorgane der ALP im Serum festzustellen, ist eine spezifische und genaue Bestimmung jeder Organ-ALP erforderlich.
Gewaltige Anstrengungen wurden durch viele Arbeitsgruppen in dieser Richtung unternommen. Dabei wurde über verschiedene Methoden zur Differenzierung der ALP's aus menschlichen Organen bzw. deren Identifizierung und Quantifizierung im Blutserum berichtet: z.B. elektrophoretische Trennung auf verschiedene Trägermedien (145, 146, 147), selektive Inaktivierung durch Hitze oder Harnstoff (148-153) spezifische Inhibierung durch Aminosäuren (154, 155).
Diese Methoden haben jedoch keine weite Anwendung im klinischen Labor für die quantitative bzw. die qualitative Identifizierung der ALP's gefunden.
Immunologische Reaktionen, die auf der Immunospezifität der Antigene zu ihren Antikörpern beruhen, bilden ein zusätzliches Kriterium für die Differenzierung der isofunktionellen Proteinen.
Diese immunoanalytische Methode kann genau einfach und schnell durchgeführt werden.
Dieser Teil der vorliegenden Arbeit untersucht die immunologische Verwandtschaft der ALP's aus verschiedenen Organen bzw. die Möglichkeit, die einzelnen Organ-ALP's durch den jeweiligen Antikörper spezifisch und quantitativ zu bestimmen. Frühere Arbeiten zur Feststellung der immunologischen Verwandtschaft

der ALP's aus verschiedenen Organen brachten jedoch gegensätzliche Ergebnisse (142, 143, 156-160). Schlamowitz und Bodensky (142) fanden eine Kreuzreaktion zwischen Anti-D-ALP (M)-Serum mit ALP aus Leber und Knochen und auch eine Kreuzreaktion zwischen dem Anti-Knochen-ALP(M)-Serum und Leber-, Nieren- und zum Teil Dünndarm-ALP. Sussman et al (143)berichteten, daß die Dünndarm-ALP nicht mit dem Anti-Pl-ALP(M)-Serum reagiert. Dieselben Autoren berichteten, daß ein monospezifisches Anti-Leber-ALP(M)-Serum gewonnen werden konnte. Fishman et al (154, 155) fanden eine Kreuzreaktion zwischen Placenta- und Dünndarm-ALP. Pankovich et al (158) demonstrierten die Existenz von 4 antigenisch unterschiedlichen menschlichen ALP's: Leber, Knochen, Dünndarm und Placenta. Jedoch fanden sie auch, daß Antiseren gegen Placenta- und Dünndarm-ALP mit der Knochen-ALP reagieren. Boyer (156) klassifizierte die menschlichen ALP's in 3 antigenische Gruppen: Dünndarm; Placenta und nicht Dünndarm nicht Placenta Gruppe.

Die voneinander abweichenden Ergebnisse in diesen Arbeiten sind wahrscheinlich auf den unterschiedlichen Reinigungsgrad der zur Immunisierung verwendeten Antigene und auf die unterschiedlichen Tier-Spezies, die zur Gewinnung von Antiseren verwendet wurden, zurückzuführen. Zum Beispiel haben Sussman et al (143) Schafe für die Erzeugung von Antiserum gegen ALP verwendet. Dieses Antiserum bildete mit den homologen Antigenen einen löslichen Ag-Ak Komplex, der erst nach Zugabe von Anti-Burro-γ- Globulin präzipiert werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit ist die Heterogenität der ALP innerhalb jedes untersuchten Organs deutlich demonstriert. In der Dünndarm-ALP des Menschen existieren 3 multiple Formen, die unterschiedliche elektrophoretische Eigenschaften haben, die aber immunologisch identisch sind, was die Annahme, die im ersten Teil dieser Arbeit aufgestellt wurde, bestätigt. Auch in der Placenta-ALP sind die multiplen Formen immunologisch identisch.

Die gegenseitige Immunoabsorption zwischen dem Antiserum gegen Placenta- und Dünndarm-ALP mit ihren heterologen Antigenen zeigte, daß beide ALP-Isoenzyme einen gewissen Prozentsatz gemeinsamer ähnlicher oder identischer Determinanten ihrer Proteinstruktur haben. Jedes Isoenzym besitzt aber eigene spezifische Determinanten, die wahrscheinlich nicht in dem anderen Isoenzym vorhanden sind. Diese partielle Identität konnte aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse nicht auf die Existenz von gemeinsamen Untereinheiten in der Quartärstruktur der beiden Isoenzyme zurückgeführt werden. Diese immunologische Verwandschaft muß eher auf ein gemeinsames Urprotein, das als Folge von Mutationen zur Entstehung von unterschiedlichen spezifischen Determinanten mit der Erhaltung eines gewissen Prozentsatzes an ursprünglichen Determinanten in beiden Isoenzymen zurückgeführt werden.
Frühere Arbeiten (157, 158, 161) demonstrierten die Heterogenität der alkalischen Phosphatase aus menschlichen Nieren-Präparaten und zeigten die Existenz von mindestens zwei Enzym-Formen. Kein Versuch zu ihrer Isolierung bzw. genauen Identifizierung wurde jedoch unternommen. In der vorliegenden Arbeit ist die Nieren-ALP-Heterogenität weitgehend aufgeklärt, wobei die Existenz von zwei antigenisch unterschiedlichen ALP-Isoenzymen deutlich demonstriert wurde. Ihre Isolierung erfolgte durch präparative IEF oder durch Kationenaustauscher-Chromatographie der durch Neuraminidase-Behandlung angereicherten Ni-ALP. Die kleinere Form (10 %) ist immunologisch identisch mit der Dünndarm-ALP und kann daher durch Immunoabsorption mit Anti-D-ALP(M)-Serum aus dem Nieren-ALP-Extrakt entfernt werden. Die Hauptform der Nieren-Phosphatase existiert in mehreren multiplen Formen, die sich nur durch ihren Gehalt an Sialinsäure-Resten unterscheiden, aber immunologisch identisch sind. Die Entfernung von Sialinsäure-Resten aus der Nieren-ALP hat keinen Einfluß auf ihre immunologischen Eigenschaften.
Die immunologische Identität zwischen den Nieren- bzw. Leber- und den übrigen Organ-ALP's außer der Placenta- und Dünndarm-ALP war für uns überraschend und zugleich enttäuschend. Diese

immunologische Identität kann nicht auf die Existenz der einen oder anderen Organ-ALP in den zur Immunisierung verwendeten Nieren- bzw. Leber-ALP-Präparaten zurückgeführt werden, da aufgrund der im ersten Teil dieser Arbeit ausführlich beschriebenen Reinigung und Eigenschaften der isolierten bzw. zur Immunisierung verwendeten Enzym-Formen diese Möglichkeit mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Die Immunoabsorption der beiden Anti-Ni und Le-ALP-Seren durch deren heterologe Antigene führte zum Verlust der Antiserum-Immunoreaktivität sowohl gegenüber diesen Antigenen als auch gegenüber den mit ihnen immunologisch reagierenden Organ-ALP's. Dies deutet darauf hin, daß die gleichen antigenischen Determinanten oder ein beträchtlicher Prozentsatz gemeinsamer Determinanten in diesen ALP's vorhanden sind. Die Kreuzreaktion (partielle Identität) zwischen dem Anti-Ni-ALP-Serum und alkalischer Phosphatase aus Kälber-Niere, Leber, Milz und Pankreas weist wiederum auf die Existenz von Spezies-spezifischen Determinanten hin.
Die immunologische Verwandtschaft zwischen den menschlichen- und tierischen (Kalb und Schwein) -Dünndarm-ALP's wurde hier untersucht, in der Hoffnung, auch monospezifische Antiseren gegen tierische Antigene gewinnen zu können, die ihrerseits für die spezifische und quantitative immunologische Bestimmung der einzelnen menschlichen ALP's verwendet werden können. Dies gelang für ALP aus Dünndarm und Placenta, indem die Antiseren gegen Kälber-Dünndarm durch menschliche Placenta-ALP und umgekehrt absorbiert wurden.
Jedoch scheiterte es bei Nieren- und Leber-ALP's aufgrund deren immunologischen Identität innerhalb der einzelnen Spezies, obwohl es Spezies-spezifische Unterschiede zwischen diesen Organ-ALP's gibt. Diese gefundenen immunologischen Eigenschaften der verschiedenen ALP's bestätigten deren Klassifizierung in drei antigenische Gruppen: Dünndarm-, Placenta- und die übrigen Organ-ALP's (darunter Leber-, Niere- und Knochen-ALP's).

Damit erlaubt die quantitative immunoanalytische Methode nur die Bestimmung bzw. die Differenzierung der ALP's in 3 Gruppen entsprechend deren antigenischen Eigenschaften, d.h. daß die Dünndarm- und Placenta-ALP's spezifisch, die übrigen Organ-ALP's (Leber, Knochen usw.) als gesamte Gruppe, aber nicht differenziert, bestimmt werden können. Es bieten sich jedoch noch andere Möglichkeiten zur Differenzierung dieser dritten Gruppe (insbesondere für Knochen- und Leber-ALP's) an, die aber eher qualitativ als quantitativ sind, und zwar auf der Basis ihrer elektrophoretischen und biochemischen (Hitze-Stabilität & Harnstoff-Labilität) Eigenschaften.

TEIL III

Untersuchungen über die alkalischen Phosphatasen in Faeces, Gallenflüssigkeit, Urin und Blutserum des Menschen.

Diskussion.

1. Alkalische Phosphatase aus menschlicher Faeces:

Es ist seit langem bekannt, daß die alkalische Phosphatase in menschlicher und tierischer Faeces enthalten ist. Jedoch wurden über unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Eigenschaften und die Herkunft dieser ALP berichtet (162, 163).

Um diese Frage zu klären, sollte die in den Faeces des gesunden Menschen vorkommende ALP isoliert und gereinigt bzw. ihre biochemischen und immunologischen Eigenschaften festgestellt werden. Gleichzeitig sollte der diagnostische Wert einer ALP-Bestimmung in der Faeces bei verschiedenen Erkrankungen des Verdauungstrakts untersucht werden.

1.1. Isolierung und Reinigung der alkalischen Phosphatase aus menschlicher Faeces:

1) Rohextrakt: Zehn Proben frische Faeces von gesunden Mitarbeitern wurden zunächst auf ihren Gehalt an ALP-Aktivität untersucht. Je 1 g Probe wurde einmal nur mit 5 ml Puffer A und zum anderen mit 5 ml desselben Puffers + 1.5 ml n-Butanol homogenisiert. Beide Mischungen wurden dann über 12 Stunden gerührt, bei 20,000 x g abzentrifugiert und anschließend wurde die wäßrige Phase abgetrennt. Der Gehalt an ALP pro Gramm Faeces (Naßgewicht) im Falle der Butanol-Extraktion lag zwischen 4 bis 7 Einheiten; im Falle der Extraktion nur mit Puffer betrug er 2 bis 4 Einheiten. Zum Vergleich wurden ca. 25 ALP-Einheiten aus 1 g Dünndarm durch Homogenisierung und Butanol-Extraktion gewonnen.

Für die vorliegende Aufarbeitung wurde ca. 1 kg frischer Faeces gesammelt und sofort mit Puffer A und Butanol in den oben genannten Verhältnissen homogenisiert. Das Homogenat wurde über Nacht gerührt und anschließend bei 35 000 x g abzentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgetrennt, wieder abzentrifugiert und durch Glaswolle filtriert.

2) Acetonfraktionierung: Der dunkelbraune Extrakt wurde auf $0^{o}C$ abgekühlt und durch Zugabe von stark gekühltem Aceton fraktioniert.

Der Niederschlag, der zwischen 30 bis 70 % (v/v) an Aceton ausfiel, wurde in Puffer A aufgenommen und gegen denselben Puffer dialysiert.

3) Anionenaustauscher-Chromatographie auf QAE-Sephadex A-50: Die dialysierte Enzymlösung wurde auf eine QAE-Sephadex Säule (60 x 5 cm), die vorher mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen. Nach dem Auswaschen des nicht adsorbierten Materials wurde die ALP durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 0.4 M in einem Gesamtvolumen von 3 L eluiert. Die eluierte ALP-Aktivität wurde gesammelt und konzentriert. Das Elutionsdiagramm ist auf der Abb. 71 dargestellt.

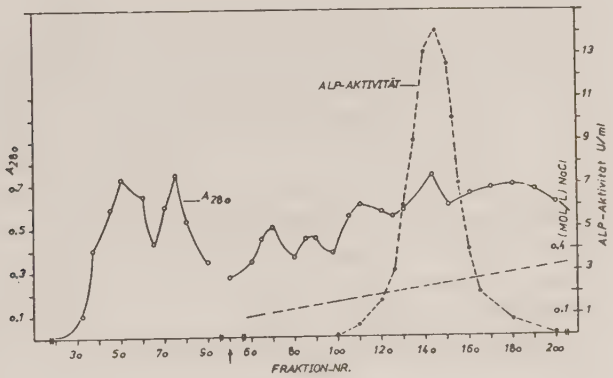


Abb. 71: Chromatographie von Alp aus menschlichem Faeces auf QAE-Sephadex A-50.
Säule: 60 x 5 cm
Puffer: Puffer A; Gradient: 0-0.4 M NaCl in 3 L Puffer
Fraktionsvolumen: ca. 12 ml
-----: NaCl Gradient

4) Gelfiltration auf Sephadex G-200: Die konzentrierte Enzymlösung wurde auf eine mit Puffer A + (0.1 M NaCl + 0.02 mM Zn^{2+} äquilibrierten Sephadex G-200 Säule (113 x 4.5 cm) aufgetragen und mit demselben Äquilibrierpuffer eluiert. Die Fraktionen mit ALP-Aktivität wurden vereinigt, konzentriert, gegen eine 1%ige Glycinlösung (pH 7.2) dialysiert und auf einer Sephadex G-25 Säule (50 x 4 cm) entsalzt.

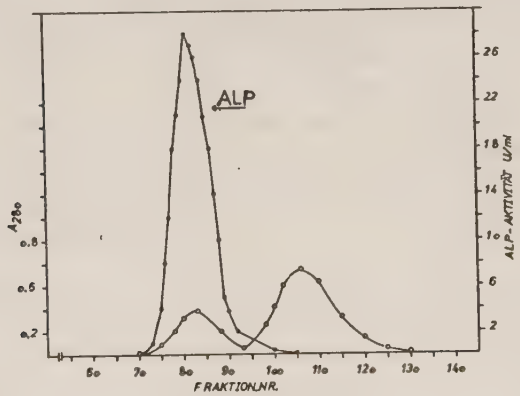


Abb. 72: Chromatographie von Faeces-ALP auf Sephadex G-200
Säule: 113 x 4.5 cm
Puffer: Puffer A + 0.1 M NaCl + 0.02 mM Zn^{2+}
Fraktionsvolumen: ca. 12 ml
Mittlere Durchflußgeschwindigkeit : 17 ml / Std.

5) Präparative isoelektrische Fokussierung: Die isoelektrische Fokussierung wurde im Saccharose-Dichtegradienten mit einem Ampholin von pH-Bereich 3.5 bis 7 wie vorher beschrieben (s. Teil I), durchgeführt. Dabei wurden zwei ALP-Aktivitätsgipfel aufgetrennt. Die Hauptaktivität (ca. 80 % der Gesamtaktivität) ist im ersten Gipfel und besitzt einen pI von 4.2. Der zweite Gipfel enthielt ca. 20 % der Gesamtaktivität und hat einen pI von 5.1.

Nach Rechromatographie der beiden isolierten Enzymformen auf Sephadex G-200 Säulen zeigten sie in der analytischen PAAG-Disk-Elektrophorese jeweils nur eine einzige Proteinbande.

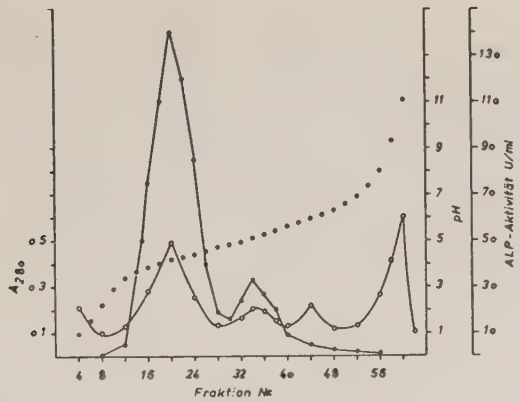


Abb. 73: Präparative isoelektrische Fokussierung von ALP aus den menschlichen Faeces.
Trägerampholin: pH-Bereich 3.5 - 7
——— o ——— Absorption bei 280 nm
——— • ——— ALP-Aktivität
. . . . . pH-Gradient

Tabelle (17): Schema über die Reinigung der alkalischen Phosphatase aus den Faeces des Menschen

	Reinigungsschritt	Gesamt-Aktivität (U)	Gesamt Protein (mg)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigungs-faktor (n-fach)	Ausbeute (%)
1	Rohextrakt	5360	2978	1.8	1	100
2	Acetonfraktionierung 30 - 70 % (v/v)	4280	713.3	6.0	3.3	79.1
3	Anionenaustauscher-Chromatographie an QAE-Sephadex A-50	3644	80.0	45.53	25.3	68
4.	Gel-Chromatographie an Sephadex-G 200 Säule	3170	23.0	138.0	76.6	59
5.	Präparative isoelektrische Fokussierung					
	Fraktion I*	2018	9.8	206	114.4	37.6
	Fraktion II**	410	2.2	186	103.3	7.6

* : Hauptfraktion mit pI von 4.2; ** : Nebenfraktion mit pI von 5.1

Beide Enzymformen hatten ein MG von ca. 150 000 (wie es durch Gelfiltration auf einer Sephadex G-200 Säule bestimmt wurde). Ihre biochemischen Eigenschaften, wie Hemmung durch L-Phe, Michaelis-Konstante (K_m) und die relative Hitze-Stabilität bei 56°C, sind die gleichen wie die der Dünndarm-ALP des Menschen (s.Teil I). Beide Enzymformen der Faeces-ALP besitzen auch Pyrophosphatase-Aktivität.

1.2. Immunochemische Eigenschaften der Faeces-ALP :

Im Immunotitrationstest wurde die Faeces-ALP durch anti-Dünndarm-ALP(M) Serum quantitativ präzipitiert. Diese wurde auvh durch die Antiseren gegen Placenta-ALP sowie Dünndarm-ALP des Kalbes und Schweines quantitativ präzipitiert.

Im Immunodiffusions-Test zeigten die beiden aus Faeces isolierten Formen der ALP miteinander und mit der Dünndarm-ALP des Menschen völlige immunologische Identität (Abb. 74). Gegen Anti-Placenta-ALP(M) Serum und Anti-Dünndarm-ALP(K) Serum bildeten sie auf Agarose-Platten Präzipitatbanden, die mit den homologen Antigenen dieser Antiseren partielle immunologische Identität zeigten. Zwischen den Antiseren gegen Leber-, und Nieren-ALP und der Faeces-ALP wurde keine immunochemische Reaktion festgestellt. Alle diese Resultate deuten darauf hin, daß die im Faeces gesunder Menschen vorkommende ALP ausschließlich aus dem Darm stammt.

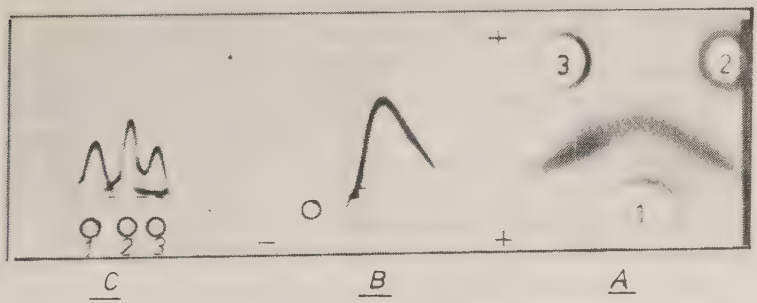


Abb.74: A) Immunodiffusion gegen Anti-D-ALP(M) Serum.
Depot 1 : Anti-D-ALP(M) Serum; Depot 2: D-ALP(M)-7U-; Depot 3 : Faeces-ALP -ca. 10 U- .
B) Zweidimensionale IE von Faeces-ALP (pI=4,2)-ca.1U- gegen Anti-A-ALP(M) Serum (1%ig).
C) Tandem-Immunoelektrophorese .
Depot 1: D-ALP(M)-ca. 0.5U-; Depot 2: Faeces-ALP-ca. 0.5U-; Depot 3: D-ALP(M)-ca. 0.5U-.
Antiserum: Anti-D-ALP(M) Serum (0,8%ig) .

1.3. Untersuchung der alkalischen Phosphatase in den Faeces von Menschen mit Krankheiten des Verdauungstraktes:

Frische Proben von verschiedenen Patienten (Innere Abteilung des Augustina-Krankenhaus, Bochum) wurden uns zur Verfügung gestellt. In allen untersuchten Fällen wurde die ALP in den Faeces in relativ stark erhöhten Mengen ausgeschieden. Jedoch im jeweiligen Serum der Patienten wurde keine parallele Erhöhung der ALP festgestellt. Nur in einer der insgesamt 13 untersuchten Serum-Proben (s. Tabelle 19) wurde eine starke Erhöhung der ALP und der Alaninaminopeptidase nachgewiesen, was sehr wahrscheinlich auf eine gewisse Erkrankung anderer Organe (z.B. Leber), nicht aber auf Störungen im Verdauungstrakt zurückzuführen ist. Dies wurde bestätigt durch die immunochemische Präzipitierung dieser Serum ALP-Aktivität durch Anti Leber-ALP(M) Serum.

In Faeces der gesunden Menschen wurde keine oder eine nur sehr geringe Aktivität (0 - 8 mU) der AAP nachgewiesen. Jedoch in allen untersuchten Faeces-Proben von Patienten wurde eine relativ starke Erhöhung dieser AAP-Aktivität festgestellt (s. Tabelle 18). Um die AAP in Faeces zu bestimmen, muß nur mit Puffer homogenisiert werden, da n-Butanol in der verwendeten Konzentration diese Aktivität völlig zerstört.

Immunochemische und elektrophoretische Eigenschaften: Auch die in den Faeces der hier untersuchten Patienten vorkommenden ALP zeigte völlige immunologische Identität mit der Dünndarm-ALP, wie es auf Immunodiffusionsplatten und im Immunotitrations-Test festgestellt werden konnte. In der PAAG-Disk-Elektrophorese zeigte jede Probe unterschiedliche ALP-Bandenmuster. Dieses Verhalten läßt vermuten, daß die in den Faeces gefundenen ALP-Formen teilweise auf die Einwirkung proteolytischer Aktivitäten im Darmtrakt zurückzuführen sind, was durch die veränderten Bandenmuster einer mit Chymotrypsin und Trypsin partiell verdauten Dünndarm-ALP bestätigt werden konnte (Abb. 75).

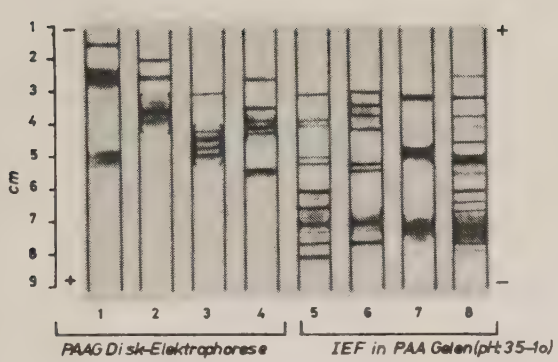


Abb. 75: Disk-Elektrophorese und isoelektrische Fokussierung von ALP aus menschlichen Faeces

1. Faeces-ALP (aus gesunden Menschen)
2. Faeces-ALP (Colitis Ulkerosis)
3. Faeces-ALP (Dickdarm Divertikulose)
4. Faeces-ALP (Morbus Crohn)
5. Faeces-ALP (Morbus Crohn)
6. Faeces-ALP (Dickdarm Divertokulose)
7. Dünndarm-ALP
8. Dünndarm-ALP (Partiell verdaut mit Chymotrypsi und Trypsin.

- Alle Gele wurden enzymspezifisch angefärbt.

Tabelle (18): Zusammenfassung der Ergebnisse der Serum- und Faeces-Proben von Menschen mit verschiedenen Krankheiten des Verdauungstraktes.

	Faeces-ALP			Serum-ALP	AAP in Faeces	AAP in Serum
Klinische Diagnose	Patient	U/g Naßgewicht	immunochemische Reaktion mit dem monospezifische Anti-D-ALP(M)Serum % Restaktivität im Überstand	mU/ml	U/g Naßgewicht	U/ml
Dickdarm Divertikulose	1	60	0	50	2,3	13
	2	55	0	44	1,9	9
	3	42	0	31	2,5	12
	4	47	0	22	1,6	20
	5	53	0	--	2,0	--
Morbus Crohn	1	38	0	25	3	11
	2	45	0	30	2,7	15
	3	40	0	45	1,5	26
	4	52	0	17	2,1	8
Colitis Ulcerosis	1	41	0	21	1,2	12
	2	37	0	30	2,3	30
	3	33	0	44	2,5	7
	4	45	0	440	2,7	282
Gesunde Personen		5 (± 2) Mittelwerte von 10 Personen	0	20-48	0-0,01	0,05-0,025

Die ALP- und AAP-Aktivitäten wurden nach den in der Test-Fibel der Firma Boehringer beschriebene Monotest-Methodendurchgeführt.

2. ALP der Gallenflüssigkeit:

Das Vorhandensein alkalischer Phosphatase-Aktivität in der Gallen-Flüssigkeit ist schon seit langem bekannt, jedoch wurden über die Natur und Herkunft dieses Enzyms widersprüchliche Ergebnisse veröffentlicht. Gutman (164) berichtete, daß diese ALP-Aktivität aus dem Serum stammt. Andere Autoren (165, 166) berichteten über die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der ALP's aus der Gallenflüssigkeit und dem Serum. Price et al (167) zeigten, daß die ALP der Galle aus der Leber stammt.

In den vorliegenden Untersuchungen sollte die ALP aus der Gallen-Flüssigkeit gereinigt und charakterisiert bzw. ihre Herkunft festgestellt werden.

2.1. Reinigung der Gallen-ALP:

Ca. 2 L Gallenflüssigkeit wurden uns von der Abteilung für Innere Medizin der medizinischen Hochschule, Hannover, zur Verfügung gestellt. Die Gallenflüssigkeit wurde zunächst mit Tris/HCl Puffer auf pH 8 eingestellt, mit n-Butanol im Verhältnis 3:1 (v/v) in einem Sorval-Omnimix homogenisiert und bei 5°C über Nacht mechanisch gerührt. Anschließend wurde bei 20 000 x g abzentrifugiert und die wäßrige Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde einer Acetonfällung unterworfen, der Niederschlag zwischen 0 - 70 % (v/v) Aceton in Puffer A aufgenommen und gegen denselben Puffer dialysiert. Die dialysierte Enzymlösung wurde dann über eine DAE Sephadex A-50 Säule (30 x 4 cm), die mit Puffer A äquilibriert worden war, aufgetragen und die adsorbierte ALP-Aktivität durch Anlegen eines linearen NaCl-Gradienten von 0 - 0,5 M in 3 L Puffer A eluiert. Das Enzym wurde zwischen 0.22 und 0.25 M NaCl eluiert. Die Enzymlösung war relativ farblos.

Aus den 2 L Gallenflüssigkeit konnten nach diesem Reinigungsschritt ca. 70 ALP Einheiten gewonnen werden, mit einem Reinigungsfaktor von 100 und einer Ausbeute von 70 %.

2.2. Elektrophoretische Eigenschaften:

In der Polyacrylamidgel-Elektrophorese zeigte die Gallen-ALP ein ähnliches Bandenmuster wie die ALP aus der Leber, wobei 2 schwache Banden mit geringerer und 2 kräftigere Banden mit höherer Mobilität auftraten (Abb. 76). Nach der Ionenaustauscher-Chromatographie zeigte das Enzym in der PAAG-Disk-Elektrophorese nur noch die intensiven Banden. Der durch densitometrische Messung ermittelte Prozentsatz dieser beiden Enzymformen an der gesamten Aktivität betrug 81 : 19. Neuraminidase-Behandlung der gereinigten Gallen-ALP führte zu einer für beide Enzymformen gleichen Verringerung der elektrophoretischen Mobilität.

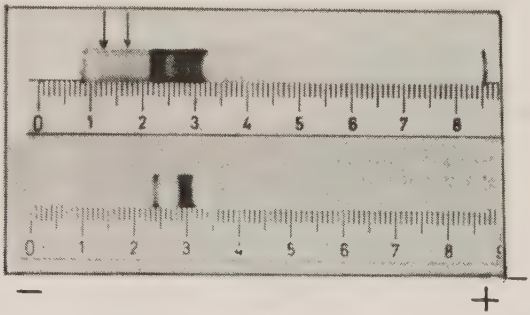


Abb. 76: Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese
von A: Gallen-ALP in der konzentrierten Gallenflüssigkeit
B: Gallen-ALP nach QAE-Sephadex-Reinigungsschritt

2.3. Immunochemische Eigenschaften:

Die Gallen-ALP wurde quantitativ durch Anti-Leber-ALP(M) Serum präzipitiert (s. Abb. 66 in Teil II). Auf Immunodiffusions-Platten gegen dieses Antiserum zeigte die Gallen-ALP völlige immunologische Identität mit dem Leber-ALP.

Anti Nieren -ALP(M) Serum präzipitierte auch die Gallen-ALP (s. Abb.56 in Teil II). Keine Reaktion wurde zwischen der Gallen-ALP und dem Antiseren gegen Dünndarm- und Placenta-ALP des Menschen sowie gegen Dünndarm-ALP des Kalbs und des Schweins festgestellt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die alkalische Phosphatase in der Gallenflüssigkeit mit der Leber-ALP identisch ist. Eine leichte Abwandlung des Enzyms beim Austritt aus der Leberzelle in die Gallenwege ist jedoch nicht auszuschließen.

3. Urin-ALP:

Im Urin von Menschen und verschiedenen Versuchstieren konnte bereits eine große Zahl von Enzym-Aktivitäten nachgewiesen werden. Von der Vielzahl der im menschlichen Harn nachgewiesenen Aktivitäten gewannen nur wenige Bedeutung für eine mögliche Verwendung in der klinischen Diagnostik, darunter die alkalische Phosphatase.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die im Harn des gesunden Menschen auftretende ALP zu charakterisieren bzw. ihre Herkunft festzustellen.

3.1. Anreicherung der ALP im normalen Harn:

Es wurde über das Auftreten von Aktivatoren und Inhibitoren verschiedener Enzymaktivitäten im Harn berichtet. Im Harn des Menschen lassen sich auch Hemmstoffe der ALP nachweisen (167). In vielen Fällen gelingt es, durch eine mehrstündige Dialyse derartige störende Inhibitoren zu entfernen (168). Ca. 2 L Harn wurden gesammelt, bei 5°C vier Stunden stehengelassen und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann gegen Puffer A, dem eine antibakterielle Substanz zugesetzt wurde, für 48 Stunden mit dreimaligem Pufferwechsel dialysiert.

Danach wurde der dialysierte Harn abzentrifugiert,mit Hilfe einer Amicon-Zelle (mit einer PM 30 Membran) bis auf 50 ml eingeengt und wieder abzentrifugiert. Aus den 2 L Harn wurden ca. 20 Einheiten-ALP gewonnen.

3.2. Elektrophoretische Eigenschaften der Harn-ALP:

Bei der Elektrophorese in PAA-Gelen zeigte die Harn-ALP eine enzymatisch aktive Hauptbande neben einer schwachen, relativ schneller wandernden Bande (Abb. 77). Inkubation der Harn-ALP mit Neuraminidase hatte keinen Einfluß auf die elektrophoretischen Eigenschaften des Enzyms.

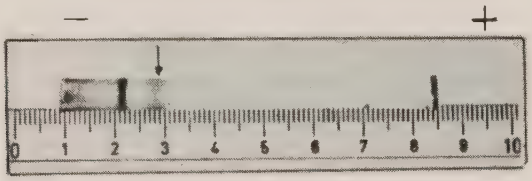


Abb. 77: Polyacrylamidgel-Disk-Elektrophorese der Urin-ALP des gesunden Menschen

3.3. Immunochemische Eigenschaften:

Im Immunotitrations-Test der Harn-ALP mit Anti-Nieren-ALP(M) Serum wurde ca. 80 % der Enzymaktivität präzipitiert. Die Restaktivität konnte erst durch weitere Zugabe von Anti-Dünndarm-ALP(M) Serum präzipitiert werden. Eine Beeinflussung der Ag-Ak-Reaktion durch die Anwesenheit irgendeiner Substanz in dem hoch konzentrierten Harn war auszuschließen, da der Zusatz reiner Dünndarm- oder Nieren-ALP zu dem konzentrierten Harn, der vorher auf 60°C erhitzt wurde, um die vorhandene ALP-Aktivität zu inaktivieren, die völlige Präzipitierung dieser ALP's durch ihre jeweiligen homologen Antiseren nicht verhinderte.

4. Serum-ALP:

Die Existenz von ALP-Aktivität im Serum ist schon seit 1923 (5) bekannt. Der Zusammenhang zwischen der Erhöhung oder Verringerung der ALP-Aktivitätsspiegel im Serum mit verschiedenen Erkrankungen ist gesichert. Inzwischen ist eine hohe Anzahl an Publikationen über dieses Thema (Serum-ALP) veröffentlicht worden. Ein Review darüber ginge über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Trotz dieser vielen Arbeiten über die Serum-ALP ist bis heute jedoch die entscheidende Frage noch nicht beantwortet, nämlich die Feststellung der Herkunftsorgane dieser Serum-ALP's bei normalen und pathologischen Zuständen bzw. die Entwicklung einer schnellen, einfachen und zuverlässigen Methode zu ihrer Differenzierung. Verschiedene Methoden, die auf elektrophoretischen, biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Organ-ALP's beruhen, wurden zur Differenzierung der Serum-ALP verwendet. Jedoch waren die meisten der berichteten Ergebnisse widersprüchlich.

In den vorliegenden Untersuchungen sollten mit Hilfe der verfügbaren Antiseren auf der Basis der Einteilung der Organ-ALP's in drei antigenische Gruppen die im Serum auftretenden Enzymformen in diese Gruppen eingeordnet werden. Die der dritten antigenischen Gruppe zugeteilten Enzymformen sollten dann aufgrund ihrer elektrophoretischen und Thermostabilitäts-Eigenschaften identifiziert werden.

In der Tabelle (19) sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Im Falle einer Zuordnung eines Teils oder der gesamten im Serum auftretenden ALP's zur dritten antigenischen Gruppe (Le, Ni, ...) erfolgte ihre weitere Differenzierung aufgrund ihrer relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten in PAA-Gelen sowie ihrer relativen Thermostabilität nach einem zehnminütigen Erhitzen auf 56°C. Die elektrophoretische Auftrennung der Serum-ALP's wurde in Polyacrylamid-Gelen nach System I in der Tabelle 13 durchgeführt. Hierbei diente der in Abb. 78 gezeichneten spektrophotometrische Skann von bestimmten Seren und Organextrakten als Marker zur Differenzierung der ALP's in anderen Seren. Aufgrund in der Literatur überwiegend übereinstimmender Berichte, daß in Seren von gesunden Kindern eine erhöhte Knochen-

ALP auftritt, wurde der im Densitogramm dieser Seren erscheinende Hauptpeak für die Knochen-Phosphatase gehalten. Auch der im Densitogramm erscheinende Hauptpeak von Seren bei Lebererkrankungen wurde als Leber-ALP identifiziert.

Die im Serum auftretenden Knochen- und Leber-ALP's besaßen eine wenig höhere elektrophoretische Beweglichkeit als ihre entsprechende Haupt-Enzymform in Organextrakten. Diese könnte auf eine leichte Abwandlung des Organenzyms beim Austreten des Enzyms aus den Gewebezellen in den Blutstrom zurückgeführt werden.

Die Auswertung der Densitogramme der aufgetrennten Serum-ALP's wurde durch einen weiteren Versuch, der auf der relativen Thermostabilität bei 56°C für 10 Min beruht, gesichert. Die Durchführung dieser Differenzierungsmethode erfolgte nach den empfohlenen Richtlinien von Moss (170) und Cadeau et al (171).

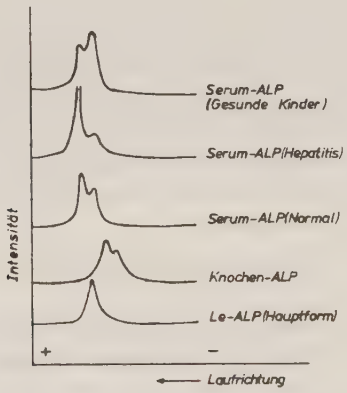


Abb. 78: Spektrophotometrischer Skann von ALP's aus Geweben und Seren, aufgetrennt durch PAAG-Disk-Elektrophorese

Tabelle (19): Differenzierung der im normalen und pathologischen Serum auftretenden Isoenzyme der ALP

Klinische Diagnose	Zahl der Proben von verschiedenen Personen	Gesamtaktivität mu/ml	Differenzierung aufgrund immunochemische Methode (Immunotitrations-Test) (Prozentsatz der im Serum vorhandenen ALP-Aktivitäten)			Differenzierung der der dritten antigenische Gruppe immunologisch zugeteilten Organ-ALP's aufgrund ihrer elektrophoretischen Wanderung in PAA-Gelen		
			D-ALP	Pl-ALP	(Le-,Ni,-Kn-ALP,...)	Le-ALP	Kn-ALP	Andere ALP
Erwachsene Normalpersonen	10	35	0.00	0.00	100	70	30	
Hepatobiliären Erkrankungen:								
-Benigne rekurrierende intrahepatische Cholestase (Summerskill Tygsturp-Syndrom)	1	820	0.00	0.00	100	96	4	
-Leber-Cirrhose	3	320	0.00	0.00	100	90	10	
-Leber-Metastase	2	420	0.00	0.00	100	93	7	
-Leber-Hepatitis	2	560	0.00	0.00	100	95	5	
Ossäre Erkrankungen:								
-Knochen-Metastase	1	330	0.00	0.00	100	20	80	
-Knochen-Frakturen	2	290	0.00	0.00	100	16	84	
Verdauungstrakt-Erkrankungen:								
-Colitis ulverosis	3	32	0.00	0.00	100	86	14	
-Morbus Crohn	4	29	0.00	0.00		91	9	
-Dickdarm Divertikulose	4	36	0.00	0.00	100	83	17	
-Steatorrhea	1	112	60.00	0.00	40	30	10	
Schwangerschaft:								
- 3 Monaten	1	130	00.00	62.00	38	32	6	
- 7 Monaten	1	215		70.00	30	30		
Normalperson nach 3 Tagen fettreicher Ernährung	2	94	42	00.00	58	45	13	

Die ALP-Aktivität wurde nach den in der Test-Fibel der Firma Boehringer beschriebene Monotest-Methode durchgeführt.

Diskussion

Bei einer großen Zahl von Erkrankungen ist heute die Bestimmung von Enyzmaktivitäten im Serum für die Diagnostik und Verlaufbeurteilung von grundlegender Bedeutung. Außer der Bestimmung der Enzymaktivität im Serum sind auch neben anderen, die Aktivitäten im Harn, Speichel und Faeces jeweils für die Diagnose bestimmter Erkrankungen von großer Wichtigkeit. Die Bedeutung der Bestimmung eines Enzyms in bestimmten Körperflüssigkeiten oder Exkreten in der Diagnostik kann erst durch breitere Untersuchungen über seine Natur und Eigenschaften bei Normalpersonen (oder Tieren) sowie durch die Veränderungen in den enzymatischen Aktivitäten bzw. in den physiko- und biochemischen Eigenschaften unter verschiedenen klinischen und experimentellen Bedingungen festgestellt werden. Die in Teil III vorliegenden Untersuchungen erfolgten daher zu dem Zweck, die in den Faeces, im Serum, im Urin und in der Galle auftretende ALP-Aktivität zu identifizieren bzw. die Bedeutung ihrer Differenzierung für die medizinische Diagnostik zu prüfen.

Herkunft der ALP-Aktivität in den Faeces: Man kann die Enzyme des Verdauungstrakts in zwei Gruppen einteilen: Verdauungsenzyme und Resorptions- oder Transportenzyme, wobei die Physiologie und Pathologie der letztgenannten Enzymgruppe weitaus bekannter ist als die der Enzyme mit Transportfunktion. Die ALP der Epithelzellen der Darm-Mucosa scheint unter den Resorptionsenzymen eine wichtige Stellung einzunehmen. Auf ihre Teilnahme an der Fettresorption weist unter anderem der Anstieg dieser Phosphatase in der Lymphe und im Serum nach fetthaltigen Mahlzeiten hin (172; 173; 174).

Der Bürstensaum der Darmschleimhaut enthält mindestens 15 Proteine oder Untereinheiten mit einem MG zwischen 19,000 und 270 000. Die größten Protein-Moleküle mit einem MG von 150 000 bis 270 000, darunter die Saccharidase und die ALP, konnten durch die Einwirkung von Papain aus dem Bürsten-Strukturen entfernt werden. Die Beziehung zwischen der Größe und der relativen Geschwindigkeit des Turnovers eines Proteins aus den Dünndarm-Bürstensaumstrukturen ist umgekehrt proportional (175). In den Faeces werden auch täglich abgestoßene Darmschleimhautzellen

ausgeschieden. In den Darm gelangen aber außer der Schleimhaut-ALP auch Phosphatasen aus Galle, Pankreas, und Serum. Zu der ALP-Aktivität in den Faeces könnten auch Produkte der Darmflora beitragen. Daher kann angenommen werden, daß in den Faeces mehrere ALP's vorkommen. Die in den vorliegenden Ergebnissen gefundenen immunologischen und biochemischen Eigenschaften der in den Faeces auftretenden ALP-Aktivität läßt den Schluß zu, daß sie ausschließlich aus der Darm-Mucosa stammt. Nach den elektrophoretischen und biochemischen Untersuchungen von Fišer-Hermann (162) sollte der Hauptteil der Faeces-ALP aus dem Darm stammen.

Nach Bodansky (176) wiegen frische Faeces gesunder Personen 60 bis 250 g pro Tag (im Durchschnitt 150 g). Bei einer durchschnittlichen Gesamtaktivität pro Gramm frischer Faeces von 5 U, würden gesunde Erwachsene pro Tag etwa 750 Einheiten ALP ausscheiden. Bei einem täglichen Gallenfluß von ca. 500 ml und einer minimalen Phosphatase-Aktivität der Gallenflüssigkeit von 0.1 U/ml würden täglich ca. 50 U Gallen-ALP in das Darm-Lumen gelangen, d.h. genug Aktivität, um sie durch immunochemische oder physikochemische Methoden zu erfassen. Da die Gallen-ALP nicht mit dem Antiserum gegen Dünndarm-ALP(M) reagiert und die gesamte ALP in den Faeces-Extrakten durch dasselbe Antiserum quantitativ präzipitiert wurde, kann geschlossen werden, daß die in dem Verdauungstrakt angelangte Gallen-ALP bei ihrem Eingang in das Dünndarm-Lumen völlig inaktiviert werden muß. Die gleiche gilt auch für Pankreas-ALP.

Die relativ starke Erhöhung der ALP- und Alaninaminopeptidase-Aktivitäten in den Faeces von Personen mit verschiedenen Verdauungstrakt-Erkrankungen kann daher nur auf verstärkte Exkretion aus bzw. Abstoßung der Darmschleimhautzellen zurückgeführt werden.

Die Bestimmung der ALP- und der AAP-Aktivitäten in den Faeces kann daher nur Bestätigung eines klinischen Verdachts auf Verdauungstrakt-Störungen herangezogen werden.

Die Feststellung, daß die Faeces-ALP in einer abgewandelten Form in den Faeces auftritt, ist sehr wahrscheinlich auf den physiologischen Prozeß ihrer Ablösung aus den Membranstrukturen des Bürstensaumes der Darmschleimhaut und auf proteolytische Aktivitäten im Darm-Lumen zurückzuführen.

Das relativ kleinere MG der Faeces-ALP (150 000) verglichen mit dem MG von Darm-ALP (200000) kann auf eine Änderung in der räumlichen Struktur des Dünndarmenzyms als auch auf eine Abspaltung gewisser, für die enzymatische Aktivität nicht wichtigen Peptid Bruchstücke aus der Primärstruktur des Enzyms zurückgeführt werden. Die Bestätigung der einen oder der anderen Annahme kann durch weitere Untersuchungen an dem reindargestellten Enzym aus den Faeces erfolgen. Die Gewinnung reiner ALP in angemessener Menge aus den frischen Faeces sollte nach der hier beschriebenen Reinigungsmethode kein Problem sein.

Gallen-ALP: Das Vorhandensein von ALP-Aktivität in der Galle ist bekannt, jedoch ist die Herkunft dieser enzymatischen Aktivität niemals überzeugend dokumentiert worden. Z.B. es wurde behauptet, daß diese Aktivität aus dem Serum stammt. Dalgard (177) fand, daß die ALP im Serum und in der Galle in umgekehrten Verhältnissen zueinander stehen. Dies führte ihn zu dem Schluß, daß die Gallen-ALP aus dem Serum stammte. Le Veen et al (178) behaupteten, daß die in Hunde intravenös injizierte Gallen-ALP aus deren Gallen quantitativ wiedergefunden wurde.

Cantarow und Miller (179) zeigten jedoch, daß ein erhöhter Serum-ALP-Aktivitätsspiegel nicht zu einer Erhöhung der ALP in der Galle führte. Diese Ergebnisse wurden durch die Arbeiten von Clubb et al (180) bestätigt.

Mehrere Autoren haben die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit auf verschiedenen Trägermedien zwischen Gallen- und Serum-ALP bewiesen (165; 166). Price et al (167) führten elektrophoretische und kinetische Untersuchungen an der auf DEAE-Cellulose gereinigten Gallen-ALP durch und schlugen vor, daß die Haupt-Enzymform der Gallen-ALP aus der Leber stammte, und als ein Protein-Phosphatidylcholin-Komplex vorhanden ist.

Aus den vorliegenden Untersuchungen ist die heterogene Natur der in der Galle auftretenden ALP festgestellt worden. Die elektrophoretische Beweglichkeit in PAA-Gelen deutet nicht auf ihre Abstammung aus dem Blutserum hin. Die elektrophoretische und biochemische Ähnlichkeit sowie die immunologische Identität zwischen der Gallen- und der Leber-ALP kann nur auf die Abstammung der ALP-Aktivität in der Gallenflüssigkeit aus den Leberzellen zurückgeführt werden.

Die Untersuchung der ALP in entnommenen Proben aus der Gallenflüssigkeit im Falle des klinischen Verdachts einer Störung der Leberfunktion kann daher von medizinisch-diagnostischer Bedeutung sein.

Urin-ALP: Trotz der zahlreichen Einzelmitteilungen über Urinenzymaktivitäten, liegen über die diagnostische Anwendbarkeit der Enzymbestimmung im Harn widersprüchliche Berichte vor. Unter normalen Bedingungen stammen die Enzymaktivitäten des Urins aus folgenden Quellen: Aus dem Serum durch glomeruläre Filtration kleinmolekularer Proteine (MG $<$ 80 000); aus der Niere, indem im Rahmen des normalen Turnover laufend Zellen abgestoßen und desintegriert werden; als Folge der Permeation in den Nierenkanälchen gelangen auch Enzyme aus den lumennahen, besonders enzymreichen Bürstensäumen der Tubulus-Zellen in den Harn; aus Epithelzellen der ableitenden Harnwege und aus Drüsen des Urogenitaltraktes.

Alle krankhaften Prozesse, die entweder mit einem vermehrten Zugrundegehen von Nierenzellen oder mit einer Störung der glomerulären Permeabilität verbunden sind, führen zu einer Steigerung mehrerer Enzym-Aktivitäten, darunter der ALP im Urin (181). Diese Erhöhung der ALP-Aktivität im Urin bei praktisch allen akuten und subakuten Nieren-Veränderungen machen eine spezifische Diagnostik durch Bestimmung dieser Enzymaktivität unmöglich (182). Die Frage der Herkunft und Natur der im Urin auftretenden ALP-Aktivitäten beschäftigten jedoch seit langem viele Arbeitsgruppen.

Über die Heterogenität der ALP im normalen Urin wurden unterschiedliche Berichte veröffentlicht, die wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Techniken, die für die ALP-Auftrennung verwendet wurden, zurückzuführen sind. (183; 184; 185;186).

Biochemische Untersuchungen von Butterworth (161) zeigten, daß es sich bei der ALP des Urins nur um Bruchstücke der ALP der Niere handelt (MG: 75 000).

Bei der Auftrennung der ALP des Harns konnten insgeamt bis zu 10 Fraktionen solcher Bruchstücke mit enzymatischer Aktivität nachgewiesen werden (187).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten elektrophoretischen Untersuchungen in PAA-Gelen zeigten im Harn die Existenz

von einer Haupt-Enzymform neben einer kleineren Enzymform mit relativ höherer anodischer Mobilität. Die scharfe Auftrennung der Hauptform des Harns in PAA-Gelen deutet auf gewisse Unterschiede zu den normalerweise diffus auftretenden ALP's der Nierenextrakte hin. Aus den immunochemischen Untersuchungen kann geschlossen werden, daß die Haupt-Enzymform der ALP im normalen Harn der dritten antigenischen Gruppe der ALP's (Ni, Le, Kn, ...) zuzuordnen ist. Somit gibt es für ihre Herkunft nur zwei Möglichkeiten; die Niere und das Serum. Die unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit der Harn- und der Serum-ALP läßt vermuten, daß die Harn-ALP überwiegend aus dem Nierengewebe stammt.

Die Teilpräzipitierung (15 %) der im Harn auftretenden ALP-Aktivität durch das Anti-Dünndarm-ALP(M) Serum kann auf der Existenz einer Enzymform in den Nierengeweben beruhen, die mit dem Dünndarm-Isoenzym identisch ist. Diese Enzymform müßte daher auch in den Harn gelangen. Die relativ höhere Konzentration an Anti-Nieren-ALP(M) Serum, die nötig ist, um die Haupt-Harn-Enzymform zu präzipitieren, verglichen mit der zur Präzipitation der Nieren-ALP-Hauptform mit gleicher Gesamtaktivität notwendigen Menge des gleichen Antiserums, ist wahrscheinlich auf eine Änderung in der Quartärstruktur des Harn-Enzyms zurückzuführen, so daß diese Enzymform eine geringere Affinität zu diesem Antiserum erhält.

Serum-ALP: Die nicht übereinstimmenden Ergebnisse über die Natur und die Herkunftsorgane der in normalen und pathologischen Seren auftretenden ALP-Aktivität, trotz der seit einem halben Jahrhundert sehr zahlreichen Veröffentlichungen darüber, ist zum Teil auf die isoenzymatische Natur der ALP's selbst als auch auf die zu diesem Zweck von einem Autor zu einem anderen unterschiedlich verwendeten Methoden oder Kombination von Methoden (elektrophoretischer oder biochemischer Art) zurückzuführen.

Im Gegensatz zur ALP liegt die LDH in fünf verschiedenen Enzymformen vor, die sich in ihren biochemischen und physikochemischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Die verschiedenen Gewebe enthalten unterschiedliche Proportionen dieser fünf Isoenzyme der LDH, d.h. beim Vorliegen aller fünf Isoenzym-

formen in zwei verschiedenen Geweben ist bei der Elektrophorese auf irgendeinem Trägermedium die am weitesten wandernde LDH-Komponente z.B. des Herzmuskels mit dem am weitesten wandernden Enzym eines beliebigen anderen Gewebes identisch. Das ist aber nicht der Fall bei der ALP, wobei die Existenz weiterer multipler Formen für jede Organ-ALP noch weitere Komplikationen für deren Differenzierung verursacht.

Die im gesunden menschlichen Serum vorkommenden ALP's, wie auch mehrere andere Enzyme, haben niedrige, aber stabile Konzentrationen. Diese relative Stabilität der Serum-ALP unter normalen Bedingungen wurde von vielen Autoren auf eine konstante Abgabe dieses Enzyms von bestimmten Organen in den Blutkreislauf zurückgeführt. Das wichtigste Argument für diese Beziehung zwischen den zirkulierenden ALP's und den Organ-ALP's (außer dem Darm) wurde von der Feststellung, daß bei Hypophosphatasie eine gleichzeitige Erniedrigung der ALP-Konzentration in Geweben und im Serum auftritt, geliefert. Die gleichbleibende ALP-Konzentration in der Dünndarm-Mucosa bei dieser Krankheit ließ manche Autoren vermuten, daß die vom Dünndarm über das Lymphsystem in die Leber gelangende ALP inaktiviert oder modifiziert wurde. Viele Theorien zur Ergründung der Herkunftsorgane der ALP im normalen Serum wurden vorgeschlagen; davon sind hier zu erwähnen die sogenannten "Retentions" und "Hepatogene" Theorie (180). Die erste behauptet, daß die Serum-ALP ausschließlich aus ossären Geweben stammt; die zweite Theorie besagt, daß der Hauptteil der Serum-ALP hepatischer Herkunft ist. Aufgrund der laufend publizierten Ergebnisse über Serum-ALP's scheint jedoch keine dieser Theorien die einzig richtige für die Erklärung der Natur der Serum-ALP zu sein. Yong (188) konnte durch Untersuchungen von über 2000 Seren zeigen, daß an der Serum-ALP-Aktivität im normalen Serum mehrere Organe beteiligt sein können; z.B. in Seren von Kindern stammt die ALP überwiegend aus dem Knochen-Organ; im adulten Menschen konnte Yong neben der überwiegenden Leber-Enzymform keine Knochen-ALP feststellen, jedoch fand er auch eine geringe Konzentration von Dünndarm-ALP in den meisten untersuchten Seren. Das Vorkommen einer Dünndarm-Enzymform im normalen Serum ist jedoch umstritten. Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen dieser Enzymform mit den Blutgruppen (B ; O) und dem Sekretor-Status (ABH) der einzelnen Menschen

festgestellt (189; 190; 172). Eine Korrelation zwischen der ALP-Aktivität in der Lymphe bei fettreicher Ernährung wurde gezeigt (191).

Aus den zahlreichen Publikationen über die Serum-ALP kann man zusammenfassend schließen, daß die ALP-Aktivität im normalen Serum hauptsächlich aus hepatischen bzw. ossären Geweben stammt. Eine Erhöhung der Serum-ALP kann dann durch Erkrankung dieser oder anderer Organe sowie auch unter bestimmten physiologischen (Schwangerschaft) bzw. Nahrungsbedingungen verursacht werden. Die in dieser Arbeit verwendete bzw. vorgeschlagene Methode, die auf der Kombination des Immunotitrations-Tests mit der elektrophoretischen Auftrennung in PAA-Gelen und dem Thermostabilitäts-Test beruht, bietet ein analytisches Hilfsmittel zur Differenzierung der ALP im Serum. Das in der Literatur häufig bestrittene Vorhanden- bzw. das Nichtvorhandensein der Dünndarm- oder Placenta-ALP im Serum konnte durch die Verwendung der jeweiligen monospezifischen Antiseren exakt und quantitativ nachgewiesen werden. Es konnte z.B. in den hier untersuchten Seren von zehn gesunden adulten Menschen festgestellt werden, daß hauptsächlich nur die Leber-Enzymform neben einer geringen Beteiligung der Knochen-Phosphatase vorhanden ist. In den Seren von Kindern wurde eine höhere Beteiligung des Knochen-Enzyms an der Serum-ALP festgestellt bzw. bestätigt. Der Nachweis eines Dünndarm-Enzyms in Seren von Personen mit der Blutgruppe (0) nach fettreichen Mahlzeiten wurde hier sicher erbracht. Bei der Erkrankung bestimmter Organe (Leber, Knochen usw.) konnte festgestellt werden, daß die Erhöhung des Serum-ALP-Aktivitätsspiegels von dem betroffenen Organ(en) verursacht worden sein mußte. Damit weist die Identifizierung der für die Erhöhung der ALP-Aktivität im Serum verantwortlichen Isoenzymform mit Sicherheit auf das geschädigte Organ hin und ist somit für die klinische Diagnose von großer Bedeutung.

Der durch die enorme Zahl an Veröffentlichungen hervorgerufenen Verwirrung in der Interpretation der vielen Ergebnisse über das Thema "Serum-ALP" in normalem und pathologischen Zustand verursacht durch die Vielfalt der Methoden, die von einer Arbeitsgruppe zur anderen abweichend sind, wird durch eine strikte Verfolgung der hier verwendeten bzw. vorgeschlagenen Kombination der Immunotitration mit elektrophoretischer Auftrennung (in PAA-Gelen) und dem Thermostabilitätstest ein Ende bereitet und damit ein Beitrag in Bezug auf die Verwendung dieser Enzymbestimmung im Serum im Dienste der klinischen Diagnostik geleistet.

IV Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die alkalische Phosphatase aus Menschen- und Kälberdünndarm sowie aus der Leber, der Niere und der Placenta des Menschen wurde bis zu einer von fremden Proteinen freien Enzymform(en) gereinigt, bewiesen durch elektrophoretische und immunologische Kriterien. Dabei fanden folgende Reinigungsschritte Anwendung: n-Butanol-Extraktion; Ammoniumsulfatfällung; Acetonfraktionierung; Ionenaustauscherchromatographie; Gelfiltration und isoelektrische Fokussierung im Saccharose-Dichtegradienten.

2. Die heterogene Natur (multiple Formen) der alkalischen Phosphatase in jedem untersuchten Organ wurde festgestellt. Drei bzw. zwei ALP-Enzymformen konnten aus Menschen- und Kälberdünndarm durch präparative isoelektrische Fokussierung aufgetrennt werden. Der relative Anteil dieser Komponenten in den jeweiligen Organextrakten variierte um den Wert 10% bei den verschiedenen Aufarbeitungen. Sie hatten jedoch dieselben katalytischen Eigenschaften, was für eine gemeinsame Gruppe von Proteinen mit identischem aktiven Zentrum spricht.

Menschliche Nieren-ALP Präparate enthalten eine kleinere Komponente des Dünndarmtyps neben mehreren multiplen Formen, die nach Behandlung mit Neuraminidase (Entfernung von Sialinsäureresten) identisch in ihren elektrophoretischen und biochemischen Eigenschaften werden.

Wenigstens 7 multiple Formen der Placenta-ALP (relativer Anteil an der gesamten Aktivität (%): 6:31:17:13:17:12:4 (- → +) konnten durch isoelektrische Fokussierung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit Neuraminidase zeigten diese multiplen Formen eine geringere Ladung und reduzierten sich auf vier Komponenten (relativer Anteil an der gesamten Aktivität (%): 52 : 15 : 23 : 10; (- → +). Vier multiple Enzymformen der Leber-ALP konnten durch präparative isoelektrische Fokussierung im Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt werden (relativer Anteil an der gesamten Aktivität (%): 8 : 11 : 33 : 48 ; (- → +).

3. Mehrere präparative Techniken wurden auf ihre Eignung zur Reinigung bzw. Auftrennung der alkalischen Phosphatasen untersucht; dabei zeigten sich die präparative Isotachophorese in PAA-Gelen und die hydrophobe Chromatographie auf Sepharose-derivatisierten Gelen als gut geeignet für diesen Zweck.

Puffer- und Gelsysteme für eine bessere elektrophoretische Auftrennung der ALP's in Stärke- und PAA-Gelen wurden entwickelt.

4. Die alkalischen Phosphatasen aus Dünndarm, Leber, Placenta und Niere zeigten unterschiedliche Molekulargewichte; dabei besaßen die multiplen Formen innerhalb eines Organs die gleichen MG. (Dünndarm-ALP(M) = 187 000 ; Placenta-ALP(M) = 146 000 ; Leber-ALP(M) = 173 000 ; Nieren-ALP(M) = 156 500 ; Dünndarm-ALP(Kalb) = 144 000.
Die SDS-Disk-Elektrophorese zeigt, daß die alkalische Phosphatase aus dem Dünndarm, der Niere, der Placenta und der Leber jeweils aus zwei sehr wahrscheinlich identischen Untereinheiten aufgebaut ist.

5. Die alkalischen Phosphatasen aus dem Dünndarm, der Leber, der Placenta und der Niere zeigten gewisse Unterschiede in Bezug auf ihre Inaktivierung durch Harnstoff, ihre Inhibierung durch L-Phe und ihre Thermostabilität, so daß aufgrund dieser Unterschiede eine qualitative und zum Teil quantitative Differenzierung zwischen diesen Organ-ALP's möglich ist.

Alle gereinigten ALP's besaßen neben der Monoester Phosphohydrolase- auch eine Pyrophosphatase-Aktivität.

6. Präzipitierende Antiseren gegen die alkalischen Phosphatasen aus Dünndarm, Placenta, Leber und Niere des Menschen sowie aus Kälber-Dünndarm wurden durch intramuskuläre, dermale, subkutane und intravenöse Implikation der reinen Hauptkomponenten und der angereicherten Präparate dieser Organ-ALP in Kaninchen gewonnen. Bei allen Antiseren wurde die enzymatische Aktivität durch Bildung des Ag-Ak-Komplexes nicht gehemmt. Das Vorhandensein von Polyäthylenglykol (Carbowax MG 6000) in der Endkonzentration von 2-5% im

Immunotitrations-Test beschleunigte die Bildung von Ag-Ak-Komplexen und führte zugleich zu ihrer vollständigen Präzipitierung.

7. Die Antiseren gegen die alkalischen Phosphatasen aus dem Dünndarm des Menschen, des Kalbs und des Schweines präzipitierten vollständig ihre homologen Dünndarm-Antigene und zeigten partielle immunologische Identität miteinander sowie mit der alkalischen Phosphatase aus der menschlichen Placenta, was auf gemeinsame Determinanten in ihrer Proteinstruktur hinweist. Die multiplen Formen der Dünndarm-ALP von Mensch und Kalb waren jeweils immunologisch identisch. Es wurde keine Reaktion dieser Antiseren mit ALP aus Knochen, Leber, Niere (Haupt-Enzymform), Herz, Milz, Lunge, Magen, Pankreas, Gehirn, Gallenflüssigkeit, und Erythrocyten gefunden. Sie besitzen offenbar keine gemeinsamen immunologischen Determinanten.

8. Das Antiserum gegen Placenta-ALP präzipitierte sein homologes Antigen sowie die ALP's aus dem Dünndarm des Menschen, des Kalbs und des Schweines, jedoch zeigten sie partielle immunologische Identität, was auf das Vorhandensein von gemeinsamen Determinanten in ihrer Proteinstruktur hinweist. Alle multiplen Formen der Placenta-ALP sind immunologisch identisch. Die Anti-Placenta-ALP-Serum reagierte auch nicht mit den alkalischen Phosphatasen aus den Organen, mit denen die Anti-Dünndarm-ALP-Seren nicht reagiert hatten.

9. Die Antiseren gegen die Haupt-Enzymform der Nieren-ALP und die Leber-ALP präzipitierten die ALP's aus folgenden Organen: Leber, Niere (Haupt-Enzymform), Galle, Knochen, Herz, Milz, Lunge, Magen, Pankreas, Gehirn, sowie die Erythrocyten-ALP. Alle diese Organ-ALP's sind immunologisch identisch. Die multiplen Formen der ALP dieser Organe zeigten auch immunologische Identität.

Beide Antiseren gegen Leber- und Nieren-Phosphatase des Menschen präzipitierten quantitativ die ALP's aus Niere, Leber, Milz, Pankreas und Herz des Kalbes. Sie deuteten jedoch auf eine partielle immunologische Identität mit ihren

homologen menschlichen Antigenen hin. Die gleichen Antiseren reagierten nicht mit den ALP's aus dem Dünndarm und der Placenta des Menschen sowie aus dem Kälber- und Schweine-Dünndarm.

10. Monospezifische Antiseren gegen Menschen- und Kälber-Dünndarm-ALP sowie gegen Placenta-ALP konnten nach Absorption mit den gereinigten heterologen Antigenen gewonnen werden. Diese monospezifischen Antiseren konnten verwendet werden bei der immunochemischen quantitativen Bestimmung der Dünndarm- bzw. der Placenta-ALP im Serum oder anderen Flüssigkeiten in Gegenwart anderer Isoenzyme der ALP.

Aufgrund der biochemischen und immunologischen Eigenschaften der ALP's aus den verschiedenen menschlichen Organen wurden sie in drei antigenische Gruppen klassifiziert, und zwar: Dünndarm-ALP; Placenta-ALP und die übrigen Organ-ALP's zusammen.

11. Die Natur und Herkunft der alkalischen Phosphatasen in Gewebs-Flüssigkeiten und Exkreten des Menschen wurde aufgeklärt; so stammt die ALP-Aktivität in Faeces ausschließlich aus der Darm-Mucosa. Eine Korrelation zwischen der ausgeschiedenen ALP-Gesamtaktivität und dem normalen und pathologischen Zustand des Darmtraktes wurde gefunden.

Die ALP in der Gallenflüssigkeit stammt ausschließlich aus der Leber.

Der normale menschliche Harn enthält geringe ALP-Aktivität, die hauptsächlich aus den Nieren-Geweben stammt, neben einem geringen Teil, der immunologisch identisch mit der Dünndarm-ALP ist.

Die im normalen Serum der adulten Menschen hauptsächlich vorhandene ALP-Aktivität stammt aus der Leber, der Rest kann aus Knochen, Darm oder Placenta stammen.

12. Eine analytische Methode, die aus einer Kombination des Immunotitrations-Tests, der elektrophoretischen Auftrennung in PAA-Gelen und dem Thermostabilitäts-Test besteht, wurde an künstlichen ALP-Isoenzym-Gemischen sowie an Seren erprobt und ihre Reproduzierbarkeit bestätigt.

Sie erlaubt die Differenzierung der im Serum auftretenden ALP's und ist damit ein weiteres Hilfsmittel für eine Anwendung bei der Differenzialdiagnostik im klinischen Labor.

V. Methoden und Material

Methoden, die routinemäßig verwendet wurden, wie Enzymtests und Elektrophoresen, sind in diesem Abschnitt enthalten, während die Methoden, die mit einer besonderen Prozedur oder Technik verbunden sind, wie z.B. Enzym-Reinigungen, in dem jeweiligen Abschnitt beschrieben sind.

1. Allgemeine Labormethoden:

Puffer-Herstellung: Stocklösungen aus Reagenzien (p.A.) wurden hergestellt und bei 5°C aufbewahrt, um eine bakterielle Kontamination zu verringern.
Puffer-Lösungen wurden durch Titration der Säure-Komponente mit der basischen Komponente auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

2. Analytische Methoden:

2.1. Proteinbestimmung: Die Proteinbestimmung wurde nach folgenden Methoden durchgeführt:
- Biuretmethode (192): Die Proteinlösung in verdünnten Rohextrakten, die 1 - 6 mg Protein pro ml enthielten, wurden in einem Zentrifugenglas auf ein Volumen von 1,7 ml verdünnt und mit 0,3 ml 3 M TCA gefällt. Nach 5 min Stehen wurde in einer Tischzentrifuge 15 min abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 5 ml Biuretreagens versetzt. Nach 30 min Stehen bei Zimmertemperatur wurde mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 546 nm in Glasküvetten (Schichtdicke 2 cm) im Photometer Eppendorf gemessen. Der Blindwert setzt sich zusammen aus 5 ml Biuretreagenz mit 5 ml Aqua dest.
Daraus ergibt sich eine Proteinkonzentration:

$$\text{Protein (mg/ml)} = \frac{\text{Gesamtvolumen (ml) x Extinktion der Probe bei 546 nm}}{\text{Lösungsvolumen der Proteinprobe (ml)} \times \alpha \times d}$$

α = dekadischer Extinktionskoeffizient der Eichlösung bei 546 nm (cm^2/mg)

d = Schichtdicke (cm)

Wenn Haemoglobin in der Probe vorhanden ist, dann ist es notwendig, die erhaltene Absorption zu korrigieren, durch Substraktion der Absorption der Probe mit dem Biuretreagenz, aber ohne Kupfersulfat.
Biuretreagenz: 9 g Kaliumnatriumtartrat, 3 g gepulvertes Kupfersulfat und 5 g Kaliumjodid in Wasser lösen, 200 ml Natronlauge (2N) zusetzen und mit Wasser auf 1 L auffüllen.

- Proteinbestimmung durch UV-Absorption bei 260 und 280 nm nach Warburg (193): Die Extinktion der Proteinlösung wurde in einer Quarzküvette in einem Spektralphotometer Zeiss PM Q II bei 260 und 280 nm gegen den verwendeten Puffer bestimmt. Mit Hilfe der Gleichung mg Protein/ml = $(1.55 \times E_{280}) - (0.76 \times E_{260})$ nach Layne (194) läßt sich die Proteinmenge berechnen.

- Proteinbestimmung nach Lowry (195): Diese Methode ist ebenso wie die Biuret-Methode mit systematischen Fehlern behaftet.

Dazu muß beachtet werden, daß in der Proteinlösung keine Substanzen, die eine Aminogruppe enthalten, vorhanden sind, da die Reaktion dadurch gestört würde. Die Durchführung des Verfahrens folgte den Vorschriften von Hartree (196) und Schacterle et al (197).
Reagenzlösungen: Lösung I: 2 g Kaliumnatriumtartrat, 100 g Natriumcarbonat, und 500 ml (1N) Natronlauge werden gemischt und mit dest. Wasser auf 1 L aufgefüllt.
Lösung II: 2 g Kaliumnatriumtartrat, 1 g Kupfersulfat, und 10 ml (1N) Natronlauge wurde unter Zusatz von dest. Wasser gemischt und mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt.
Lösung III: 1 ml Folin-Ciocalteu-Reagens (Merck) und 15 ml dest. Wasser wurden gemischt. Die Lösung soll täglich frisch angesetzt werden.
Bestimmung: 0,2 ml dest. Wasser und 0,2 ml Probe mit maximal 70 - 100 ug Protein wurden mit 0,05 ml TCA (3M) gemischt. Nach 10 min wurde hochtourig zentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes wurde 1 ml Natronlauge (0,01 N), dann 1 ml einer Mischung von 9 ml der Lösung I und 1 ml der Lösung II zugegeben. Nach 10 min Stehen wurden 3 ml Lösung III so zugegeben, daß die Mischzeit höchstens 2 Sekunden betrug. Nach Erwärmung der Probe auf 55°C für 5 min in einem Wasserbad wurde sie anschließend in ein Wasserbad von Zimmertemperatur eingetaucht. Die Extinktion wurde dann bei 650 nm und 1 cm Schichtdicke abgelesen.
Anhand der gefundenen Extinktion wurde im Eichdiagramm das Protein aufgesucht.

2.2. Enzymtest: Wie vorher beschrieben sind die alkalischen Phosphatasen in einem größeren oder geringeren Ausmaß in allen Säugetieren vorhanden, aber die optimalen Bedingungen für deren Analyse kann von Spezies zu Spezies sowie von einem Organ zu einem anderen variieren. In dieser Arbeit war es nicht notwendig, optimale Bedingungen für jedes Enzym verschiedener Herkunft zu schaffen. Die in der vorliegenden Arbeit wiedergegebenen Enzymaktivitäten wurden ermittelt nach den hier angegebenen spezifischen Bedingungen.
Seit der ersten Messung der ALP im menschlichen Serum durch Kay 1930; (198) hat sich die Literatur zur Messung der alkalischen Phosphatase enorm vergrößert und kürzlich wurden auch automatisierte Techniken entwickelt. Zahlreiche Substrate, Puffer und verschiedene Inkubationsbedingungen wurden verwendet. Die für die ALP vorhandenen Testmethoden kann man in 2 Gruppen einteilen: Solche, die das freigesetzte Orthophosphat und solche, die den komplementären Alkohol bestimmen.

Test der enzymatischen Aktivität: Die Enzymtests wurden doppelt ausgeführt, außer den K_m-Bestimmungen, bei denen Dreifach-Bestimmungen durchgeführt wurden. Beim Test von Rohpräparaten wurden Leerwerte verwendet, bei denen am Ende der Inkubationszeit das Enzym zugesetzt wurde. Alle Enzymtests erfolgten bei 30° C.

Methode 1: Diese Methode wurde als Standard-Methode bei den Enzym-Reinigungen verwendet.
Sie wurde nach dem Prinzip von Bessey et al (199) durchgeführt. Die Reaktionsmischung enthält als Substrat PNPP (12 mM) in 0,75 M 2-Amino 2-Methyl Propanol - 1 (2-A-2-M-P-1) / HCl Puffer, pH 10, in einem Endvolumen von 0,5 ml, das auch $MgCl_2$ enthält (5 mM).

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50 ul einer Enzymlösung. Nach einer Inkubationszeit von genau 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml einer 0,05 N NaOH-Lösung gestoppt. Der freigesetzte p-Nitrophenol wurde bei 405 nm im Eppendorf-Photometer in Küvetten (d = 1 cm) gemessen.

Methode 2: Diese Methode findet Verwendung bei Messungen während kinetischer Untersuchungen. Die Reaktionsmischung bestand aus PNPP in einer Endkonzentration von 12 mM in 0,75 M 2-A-2M-P-1 / HCl Puffer, pH 10; $MgCl_2$ war in einer Endkonzentration von 5 nM vorhanden. Während der Messung wurde der Reaktionsansatz durch ein Wasserbad mit einer Pumpe, die verbunden ist mit einem Küvettenhalter eines Photometers mit Schreiber, auf 30°C gehalten. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 ul Enzymlösung gestartet und innerhalb eines Zeitraumes von 10 min wurde die Zunahme der Absorption bei 405 nm gemessen.
1 Einheit = diejenige Enzymmenge, die in 1 min unter den verwendeten Bedingungen die Hydrolyse von 1 Mol Substrat katalysiert. Die molare Absorption des PNP im verwendeten Puffer ist 18.2 $cm^2/\mu mol$.

Methode 3: Diese Methode basiert auf der Freisetzung des Phosphats (Feststellung der Pyrophosphatase Aktivität)
Die Reaktionsmischung enthält 1 ml 9 mM Substrat; 1.25 ml eines 0.02 M Tris/HCl (bzw. Carbonat-Bicarbonat) Puffer; 0.25 ml einer 12 mM $MgCl_2$ Lösung. 0.1 - 0.3 ml Enzym; aufgefüllt auf ein Gesamtvolumen von 3 ml mit Aqua dest. Die Reaktions-Mischung wurde vor der Zugabe des Enzyms auf 30°C erwärmt. Alle Reaktionen wurden für 30 min bei 30°C durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1,4 ml einer 10%igen TCA Lösung gestoppt. Das freigesetzte Phosphet im analytischen Test wurde mit Fiske Subbarow-Reagenz nach der Methode von Barlett (200) bestimmt.
Fiske-Subbarow Lösung: 0,5 g 1-Amino-2-naphthol-Sulfonsäure-(4) und 16 g Natrium Pyrosulfit ($Na_2S_2O_5$) wurden in 200 ml Wasser suspendiert. Durch vorsichtige Zugabe von 2N NaOH wurde die Aminonapholsulfonsäure in Lösung gebracht. Die Lösung wurde filtriert und in einer dunklen Flasche aufbewahrt.

Testansatz: Zu der Probelösung (4,4 ml) wurden 0,3 ml Ammoniummolybdate (15%) und 0,3 ml Fiske-Subbarow-Lösung gegeben. Nach 10 min Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Extinktion bei 660 nm gemessen. Der Phosphatgehalt wurde im Eichdiagramm abgelesen.
Für Kontroll-Bestimmungen wurde das Enzym nach Zusatz einer 10%igen TCA Lösung zu allen Testabsätzen gegeben.

3. Elektrophoretische Methoden

3.1. Diskelektrophorese nach L. Ornstein (201) und B.J. Davis (104)

Die Diskelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Das Polymerisieren fand in Glasröhrchen von 9,4 cm Länge und 0,7 cm Durchmesser statt. Die Röhrchen wurden am unteren Ende fest mit Parafilm verschlossen. Das Trenngel wird bis auf 2cm unter den Oberrand der Röhrchen eingefüllt und polymerisiert während 30 - 40 min. Durch Überschichten mit wenig Wasser

wird eine waagerechte Geloberfläche erreicht und außerdem der Luftkontakt ausgeschaltet, der die Polymerisation verhindert. Nach Beendigung der Polymerisation wurde das Wasser abgegossen und kurz mit Sammelgellösung gespült. Das Sammelgel wurde etwa 1 cm hoch über das Trenngel gegeben, mit wenig Wasser überschichtet und mit Hilfe einer UV-Lampe polymerisiert (30 - 60 min). Dann wurden Wasser und Monomere abgegossen und mit Elektrodenpuffer gewaschen. Nach Einsetzen dieser so vorbereiteten Gele wurde der auf 4°C gekühlte Elektrodenpuffer in die Vorratskammern eingefüllt.

Die aufgesetzte Probe setzt sich wie folgt zusammen:
50 - 100 ug Protein (entspricht 0,1 - 1 IU in 50 ul Enzymlösung) wurden mit 50 ul einer Mischung aus 2 ml 40%iger Saccharose und 200 ul Bromphenolblau (1%ig) durch den Elektrodenpuffer auf die Sammelgeloberfläche aufgetragen. Es wurde bei 1 - 2 mA pro Röhrchen elektrophoriert, bis die Bromphenolblau-Bande gerade in das Trenngel eintritt.
Die Trennung der Proteine erfolgte dann bei 4 - 5 mA pro Gelröhrchen in einer Laufzeit von 60 - 100 min. Die Elektrophorese wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Nach Beendigung wurden die Gele protein- und enzymspezifisch wie unter 4 angefärbt.

Stammlösungen zur Disk-Elektrophorese:

Lösung 1: TRIS-TEMED (Tetramethylenäthylendiamin), 0,4 M TRIS in 800 ml Wasser und 3 ml TEMED mit konzentrierter Borsäure, auf p^H 9,5 eingestellt, wurden auf 1 l aufgefüllt.

Lösung 2: Trenngel monomer, Acrylamid 37,5 g, Bis-Acrylamid 1 g wurden zusammen auf 100 ml aufgefüllt.

Lösung 3: Ammoniumpersulfat, 0,2 g in 100 ml.

Lösung 4: TRIS-Temed, 0,8 M in 100 ml Wasser und 0,7 ml TEMED mit konzentrierter HCl, auf p^H 7.5 eingestellt, wurden auf 1 l aufgefüllt.

Lösung 5: Sammelgel monomer, Acrylamid 1 g, Bis-Acrylamid 2g wurden zusammen auf 100 ml aufgefüllt.

Lösung 6: 50 mg Riboflavin in 100 ml Wasser.

Lösung 7: 40 g Saccharose in 100 ml Wasser.

Lösung 8: TRIS-Borat-Puffer (Elektrodenpuffer): 0,05 M, p^H 9

Die oben aufgeführten Stammlösungen sind in braunen Flaschen unter Lichtabschluß bei 2 - 4°C einige Monate haltbar. Die Ammoniumpersulfatlösung muß aber jedes Mal frisch angesetzt werden. Die Zusammensetzung des Trenngels ist: 1 Teil Lösung 1 2 Teile Lösung 2, 1 Teil Wasser, 4 Teile Lösung 3. Die Zusammensetzung des Sammelgels ist 1 Teil Lösung 4, 2 Teile Lösung 5, 1 Teil Lösung 6 und 4 Teile Lösung 7.

3.2. Stärke-Gel-Elektrophorese (202):

Die Gele wurden aus der anhydrolysierten Stärke (Connaught Laboratories, Toronto, Canada) in einer Konzentration von 12 g pro 100 ml Puffer vorbereitet. Dazu wurde die vorher berechnete Menge an Stärke mit dem Puffer in einem Rundkolben aufgeschlämmt und unter ständigem Schütteln über der Gasflamme

bis zum Sieden erwärmt. Die hochvisköse trübe Lösung wurde weiter erwärmt, bis eine klare dünnflüssige Lösung erhalten wurde. Diese wurde gleich mit Hilfe eines Reitmeyer-Aufsatzes an der Wasserstrahlpumpe kurz entgast. Vorher wurde ca. 1 ml Heparin pro 100 ml Gel zugegeben. Dies bewirkte eine glatte Gel-Oberfläche. Danach wurde sofort auf eine Glasplatte (vorher auf ca. 40°C aufgewärmt) gleichmäßig ausgegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Platte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 5° C aufgewärmt) gleichmäßig ausgegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde die Platte über Nacht in einer feuchten Kammer bei 5°C gelagert. Erst dann kann man das stabile Gel verwenden.
Puffer: Verschiedene Puffersysteme wurden auf ihre Eignung zur Auftrennung der ALP überprüft (s. Tabelle). Das diskontinuierliche Puffersystem wurde verwendet.
Proben wurden auf geeignetem Filterpapier je nach der Enzymkonzentration aufgenommen und mittels einer Klinge im Gel senkrecht eingesteckt.
Elektrophorese: Der Pherograph "Original Frankfurt" wurde verwendet. Ca. 40 V/cm; Temperatur 2 - 5°C.
Anfärbung des Gels: Nach der gleichmäßigen Entfernung der Geloberfläche mit Hilfe eines dünnen Drahtes wurde das Gel wie unter angefärbt, und unter einer Glycin-Wasser Schicht konserviert.

3.3. Präparative Disk-Elektrophorese und Isotachophorese in PAA-Gelen:

Die diskontinuierliche Elektrophorese in PAA-Gelen wurde präparativ in dem Gerät der Firma Canalco durchgeführt.
Puffer- und Gel-Systeme wurden in Teil I unter 4/5 beschrieben.
Der präparative Vorgang wurde nach den Richtlinien der Firma Canalco durchgeführt.

3.4. Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen:

Die isoelektrische Fokussierung wurde im Prinzip nach Vesterberg (203) durchgeführt.
1,5 ml Träger-Ampholin (LKB 40%, pH-Bereich 3,5 - 7; 4 - 6 oder 3,5 - 10), 0,5 ml TEMED und 15 ml einer Acrylamid-Lösung (37,5 g Acrylamid + 1 g BIS) wurden mit einer 15%igen Saccharoselösung auf ein Volumen von 48 ml aufgefüllt. Nach Entgasung wurde zu der Mischung 1 ml 1 % Ammoniumpersulfat-Lösung zugegeben und sorgfältig in Glasröhrchen eingefüllt (10 x 0,6 cm) und polymerisiert. Die Polyacrylamid-Gele wurden in ein Shandon-Disk-Elektrophoresegerät eingebracht. Das Gel wurde bis zur Höhe von 1 cm mit einer Lösung, bestehend aus 5% Saccharose und 0,5 % Ampholin, überschichtet. Die Enzymlösung wurde durch Zugabe einer Zuckerlösung auf 20 % (w/v) gebracht und 10-50 ul dieser Enzymprobe wurden sorgfältig zwischen Gel und Ampholin-Schicht gebracht. Die alkalische Lösung (oben): 1 % NaOH oder 2 % Äthanolamin. Die saure Lösung (unten): 0,5 % Phosphorsäure.
Die Elektrophorese wurde bei 5°C bei 300 V für ca. 7 Stunden durchgeführt. Die Gele wurden dann enzymatisch gefärbt.

4. Anfärbemethoden:

- Amidoschwarz 10 B-Anfärbung: Die Gele werden mit einer 0,5%igen Amidoschwarz-Lösung in 7%iger Essigsäure 1 Stunde angefärbt, die Proteinbanden während dieser Behandlung gleichzeitig fixiert. Bei der Entfärbung (2-3 Tage) wird die in Färbelösung (7%ige Essigsäure) mehrmals gewechselt. Schneller (3 Stunden) geht die Färbung elektrophoretisch bei einer Stromstärke von 10 mA pro Gel in Elektrophoreserichtung oder nach der Each-Entfärbemethode nach Prusik (204).

- Coomassie-Blue-Anfärbung in 0,5%igem Methanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 5:1:5. 1 Stunde wird angefärbt, anschließend 2 Stunden in obigem Lösungsmittel entfärbt und anschließend 2 Tage in 7%iger Essigsäure.

- Enzymspezifische Anfärbung nach E. Smith (205): Pufferlösung: 3,74 g Borsäure, 2,04 g Magnesiumchlorid werden in Aqua dest. gelöst und auf pH 9,6 mit konz. KOH-Lösung eingestellt und auf 1 l mit Aqua dest, aufgefüllt. Substratlösung: 0,2 g - Naphthylphosphat in 100 ml Puffer. Farbstofflösung: 0,1 g Fast-Blue-RR in 100 ml Puffer. Beide Lösungen werden immer frisch angesetzt und erst kurz vor der Anfärbung mit gleichen Volumenteilen gemischt unter Zugabe einer Spatelspitze Aktivkohle. Es wird filtriert. In diesem Filtrat werden die Gele im Dunkeln inkubiert, bis eine dunkelbraune Färbung entstanden ist. Die Gele werden anschließend mehrmals in Wasser gespült und in Essigsäure-Wasser im Verhältnis 1:10 (0,02 %ig an Natriumazid) aufbewahrt.

5. Molekulargewichts-Bestimmungsmethoden:

5.1. Molekulargewichtsbestimmung an Sephadex G-200 nach Whitaker (206 & Andrews (106):

Hierzu wurde eine Säule mit den Maßen 130 cm x 2,6 cm verwendet. Das Ausschlußvolumen wurde mit Hilfe von Dextranblau bestimmt (Blue dextran 2000 000, Pharmacia). Als Eichproteine dienten folgende Substanzen: Lactatdehydrogenase, Kreatinkinase, Rinderserumalbumin Katalase und GAPDH.
Nach Whitaker besteht zwischen dem Quotienten von Elutions- und Ausschlußvolumen (V_e : V_o) und dem Logarithmus des Molekulargewichtes eine lineare Beziehung.

5.2. Molekulargewichtsbestimmung nach der Methode von Hedrick und Smith (107):

Diese Methode beruht auf der Elektrophorese auf PAA-Gelen verschiedener Porositäten. Dadurch ermittelt man die MGs der nativen Proteine, wobei ihre Gestalt keine Rolle spielt.
Die Elektrophorese erfolgte in PAA-Gelen folgender Konzentrationen T = 10; 9; 8; 7; 6; 5 und 4 %. C = 3,33
Die relative Mobilität der verschiedenen Eichsubstanzen, bezogen auf Bromphenolblau, wurde ermittelt. Da log R_m (Relative Mobilität) eine Funktion der Acrylamid-Konzentration ist, ergibt ein Auftragen von log R_m gegen die Gel-Konzentration eine Reihe von Punkten, aus denen die Regressionslinie kalkuliert werden

kann. Auch besteht ein lineares Verhältnis zwischen dem Slope dieser Linie und dem MG. Ein Auftragen des Slopes aus der Regressionslinie von jedem Eichprotein mit seinem bekannten MG ergibt eine Gerade, aus der das unbekannte MG ermittelt werden kann.
Die anderen Bedingungen für die Elektrophorese, Proteinanfärbung, und enzymspezifische Anfärbung waren die gleichen wie die bei der analytischen PAA-Disk-Elektrophorese beschriebenen.

5.3. SDS-Elektrophorese:

Die Na-SDS-PAA-Gelelektrophorese wurde nach Weber und Osborn (108) nach folgender Modifikation durchgeführt:
Die Proteine (etwa 2 mg/ml) wurden in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 gelöst, der 5% Na-SDS, 8M Harnstoff und 5 % 2-Mercaptoäthanol enthielt. Die Mischung wurde sofort für 3 min in ein kochendes Wasserbad gestellt und dann für 60 min bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde gegen 500 ml des von Weber und Osborn verwendeten Puffers dialysiert.
Die Gesamtkonzentration der Gele betrug 8 %, bei einem Verhältnis von Acrylamid/BIS von 37,5 : 1. Die Gelmischungen enthielten 0,1% SDS. Zu den Proteinproben von etwa 20-50 ug wurde 0,1 % Jodacetamid gegeben und diese auf die Gele (0,6 x 10 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 3 - 4 mA pro Gelröhrchen für etwa 5 h durchgeführt. Die Gele wurden mit Coomassie brillant blue angefärbt. Als Referenzproteine dienten folgende Proteine: RSA; Ovalbumin; Carbanhydrase; Cytochrom C.
Messung der relativen Mobilität: Die relative Mobilität der einzelnen Proteine wurde durch Division der jeweiligen Wanderungsstrecke durch diejenige für Cytochrom C ermittelt. Die Verwendung eines Referenzproteins für jedes Gel korrigiert automatisch die Mobilitätsmessungen, die durch ein Anschwellen der Gele während des Anfärbens eintreten. Die relativen Mobilitäten der einzelnen Polypeptide wurden gegen den jeweiligen Logarithmus des Molekulargewichtes aufgetragen. Hierdurch wurde ein linearer Plot erhalten.

6. Immunologische Methoden

Für die Immunisierung wurden Kaninchen verwendet, die mit Trockenfutter gefüttert waren. Die Herstellung der Immunisierungssuspension erfolgte durch Zusammengeben gleicher Volumenteile von Freund'schem Adjuvans und der gegen physiologischen Kochsalzpuffer dialysierten Enzymlösung mit anschließender Emulgierung des Gemisches. Diese Emulgierung wurde dadurch erreicht, daß das Gemisch mehrmals durch eine Kanüle Gr. 12 oder 14 gepreßt wurde, bis ein entnommener Tropfen, auf eine Wasseroberfläche gegeben, nicht mehr zerfloß. Die Emulgierung mittels Ultraschallbehandlung wurde wegen der zu starken Erwärmung der Lösung vermieden.

6.1. Immunisierungsweise:

Um präzipitierende Antikörper mit einem hohen Titer zu bekommen, wurde nach unserer Erfahrung wie folgt immunisiert: Bei der

Primärimmunisierung wurde mit dem reinen bzw. angereicherten ALP's (1-2 mg) intraplantar immunisiert, was sich nach der Erfahrung am Institut als optimal erwiesen hatte. Zwei Wochen später wurde die gleiche Suspension intramuskulär, subkutan und intradermal injiziert. Wiederum zwei Wochen später wurde mit derselben Proteinmenge immunisiert, jedoch dieses Mal komplettes Freund'sches Adjuvans verwendet. 3-5 Wochen später ist die Primärantwort maximal. Nun injiziert man die gut dialysierte Enzymlösung direkt intravenös (Ohrrandvene). Um einen Schock zu vermeiden, der zum Tode des Tieres führen kann, preßt man 12 - 24 Stunden vor der eigentlichen intravenösen Injektion etwa 20 % der für die i.V.-Injektion vorgesehenen Menge. Damit erhält man die Sekundärantwort, die meist mit einer enormen Steigerung des Titers verbunden ist. Der höchste Titer liegt auch hier wieder zwischen 7 und 10 Tagen nach der i.v. Injektion.

6.1. Gewinnung des Antiserums:

Zwischen 7 und 10 Tagen nach der i.v. Injektion wurde jedem Tier etwa 50 ml Blut aus den Ohrgefäßen entnommen. Wochen nach der letzten Blutentnahme erhielten die Tiere wiederum eine Injektion in die Ohrvene. Sieben Tage danach wurde wieder Blut entnommen.
Das Blut läßt man über Nacht bei 4°C gerinnen. Das gewonnene Serum wurde abzentrifugiert und in kleinen Proben bei -16°C aufbewahrt. Die einzelnen Seren wurden auf ihre Eigenschaften untersucht.

6.3. Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony (207):

Um festzustellen, welche Ag-Ak Verhältnisse für ein stabiles System erforderlich sind, ließ man eine bestimmte Antigen-Konzentration gegen eine Ak-Verdünnungsreihe diffundieren. Auf diese Weise kann man nachweisen, ob die entstehenden Präzipitatbanden Artefakte sind oder nicht.
Diese Doppeldiffusion wurde in 0,8 %igen Agarosegelen (0,02 %ig an Natriumazid) in 15 mM Barbitalpuffer pH 8,6) - in dicht schließenden Petrischalen - während 48-60 Stunden bei 4°C durchgeführt. Anschließend erfolgte das Auswaschen (2-3 Tage je nach Hämolysegrad des Antiserums) des überschüssigen Antigens bzw. Antiserums mit 0,9 %iger NaCl-Lösung.
Proteinspezifisch wurde mit Amidoschwarz 10B (0,5%ig in Methanol zu Eisessig und Wasser im Verhältnis 6:1:6) eine Stunde gefärbt, dann zwei Stunden mit demselben Lösungsmittelgemisch und schließlich mit 7,5 %iger Essigsäure entfärbt.
Ein Parallelansatz wurde enzymspezifisch angefärbt. Die Färbelösung setzt sich wie folgt zusammen:
Lösung 1: 2 mg α-Naphthyl-Phosphat/ml.
Lösung 2: 1 mg fast blue RR/ml in 0,4 M TRIS-Borat-Puffer, pH 9,5.
Lösung 1; (20 ml), Lösung 2 (80 ml) werden kurz vor der Inkubation zusammengegeben - das Gemisch ist 5 mM an $MgCl_2$ -, mit einer Spatelspitze Aktivkohle versetzt und filtriert.
Das ausgiebig gewaschene Agarose-Gel wurde 4 - 5 min mit dem Filtrat überschichtet und 5 - 15 min im Dunkeln inkubiert.
Die Gele wurden dann in 0,9 %iger NaCl-Lösung oder Aqua dest. bei 4°C aufbewahrt.

Vor dem Trocknen müssen sowohl die protein- als auch die enzymspezifisch angefärbten Gele 1 - 2 Stunden in Aqua dest. gelegt werden. Anschließend wurden sie mit feuchtem Filterpapier blasenfrei überzogen und bei Zimmertemperatur belassen. Kurz bevor der Trocknungsvorgang beendet war, wurde das Filterpapier vom Gel abgehoben, um ein Verkleben zu vermeiden. In staubfreier Atmosphäre wurde das Trocknen beendet.

6.4. Elektroimmunodiffusion nach Grabar und Williams (208):

Diese Methode wurde von Grabar und Williams entwickelt und von Scheidegger (209) für den Mikromaßstab auf Objektträger modifiziert. Es werden 0,8 %ige Agarosegele (0,02 %ig an Natriumazid) in 15 mM Veronal-Salzsäurepuffer pH 8,6 verwendet. Das in die ausgestanzten Depots eingetragene Protein wird 80 - 100 min bei 250 Volt unter Kühlung elektrophoriert. Elektrodenpuffer ist 60 mM, Barbitalpuffer pH 8,6. Nun wird in Elektrophoreserichtung eine 2 mm breite und 6,4 mm lange Rinne ausgestanzt und etwa 100 ul Antiserum eingetragen. Es schließt sich eine 48 - 60 stündige Diffusion in einer feuchten Kammer bei 4°C an. Dann werden die Gele ausgiebig gewaschen, protein- und enzymspezifisch angefärbt und getrocknet.

6.5. Immunelektrophorese nach Laurell (210):

Eine Glasplatte (65 mm x 65 mm) in einem Plexiglasrahmen wird mit einem 1,5 cm breiten Streifen aus 0,8 %iger Agarose in 15 mM Veronal-Salzsäurepuffer pH 8,6 beschichtet. Die Enzymlösung wird in ein Depot ca. 1 cm nahe der Kathode eingetragen und 80 min lang unter Kühlung einer Elektrophorese bei 250 Volt unterworfen. Als Brücke zwischen Gel- und Elektrodenpuffer dient dickes Filterpaper (Schleicher und Schüll, Nr. 2043b). Nach Beendigung der eindimensionalen Immunelektrophorese wurde das Antiserum-Agarose-Gel auf die freie Glasfläche ausgegossen.
Dieses Gel erhält man durch Vermischen von 1,6 %iger Agarose mit 15 mM Barbitalpuffer, pH 8,6, und Antiserum bei 40 - 50°C. Die Elektrophorese erfolgt nun senkrecht zur ersten Richtung (auch unter Kühlung) in der Weise, daß das Protein in das antikörperhaltige Gel hineinwandert und präzipitiert, wodurch die typischen Laurellpeaks entstehen.
Elektrodenpuffer ist 60 mM, Barbitalpuffer pH 8,6. Eine weitere Behandlung der Gele geschah wie unter(6.3).

6.6. Eindimensionale Immunoelektrophorese:

Die eindimensionale Immunoelektrophorese erfolgte in 0,8 %igen Agarose Gelen in 10,03 M Veronal-Puffer pH 8,6.
Elektrodenpuffer war 0,06 M Veronalpuffer pH 8,6.
Die Proben wurden in Depots nahe der Kathode eingetragen und sofort einer Elektrophorese bei 250 V für ca. 10 Stunden unterworfen. Die Antiserum-Antigen Verhältnisse müssen zuerst durch Vorversuche bestimmt werden, um ideal ausgeprägte Präzipitatbogen zu erhalten.

6.7. Tandem-Immunoelektrophorese:

Bei der Tandem-Immunoelektrophorese wurden in einem Abstand von ca. 0,5 cm der Außenränder zwei Depots in einem 0,8 %igen Agarose-Streifen von 2 cm Breite gestanzt. Die Depots wurden jeweils mit den zu untersuchenden Antigenen gefüllt und man läßt sie innerhalb 1 Stunde aufeinander zudiffundieren. Erst dann wurde der Rest der Gelplatte mit einer 0,8 %igen Agarose, die das Antiserum enthält, gefüllt. Nach dem Erstarren der Gele wurden sie bei 5°C und 250 V für 10 Stunden elektrophoriert.
Gelwaschen und Anfärbung wie unter 4.

6.8. Immunotitration:

Die mit Antiserum zu titrierenden Enzympräparate wurden so verdünnt, daß ihre jeweiligen Aktivitäten mit PNPP ungefähr die gleichen waren. Die Titration dieser Enzyme wurde dann durch die Zugabe zunehmender Mengen an Antiserum zu einer konstanten Menge des jeweiligen Enzyms durchgeführt. Alle Enzym- und Antiserum-Präparate wurden vorher bei etwa 3000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Titrationskurven der verschiedenen ALP-Präparate wurden gleichzeitig gemacht, damit eine Verdünnungsfehler auszuschließen war, und somit Vergleiche zwischen den verschiedenen Enzymen gegenüber einem bestimmten Antiserum richtig waren. Die in dieser Arbeit übliche Prozedur für die Immunotitrationen war die folgende: 0,1 ml einer Enzymlösung (ca. 0,3 U) und 0,x ml des Antiserums wurden mit Puffer und PAG (Endkonzentration 2,5 %) auf 1 ml in einem Eppendorf-Gefäß aufgefüllt. Für jeden Versuch wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei jedem Titrationsversuch wurde auch eine Kontrolle durchgeführt, die kein Antiserum enthielt. Kontrollen für jedes Titrationsexperiment bestanden aus zwei Gefäßen, wie oben beschrieben, aber mit Normalserum von Kaninchen, die das entsprechende Antiserum produzierten. Zu einem Gefäß wurde diejenige Menge an Normalserum gegeben, die der im Experiment verwendeten kleinsten Menge an Antiserum entsprach bzw. zu dem zweiten Gefäß die im Experiment verwendete größte Menge.
Die Gefäße wurden gemischt und für 1 h bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert, wonach sie für etwa 3 h bei 5°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Gefäße für 5 min bei 3000 r.p.m. in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die ALP-Aktivität wurde im Überstand gemessen. Die Restaktivität im Überstand wurde ausgedrückt als Prozentsatz der Kontrolle.

6.9. Absorption der Antiseren:

Absorptionsverfahren zur Gewinnung monospezifischer Antiseren müssen zur Vermeidung irreführender Ergebnisse aufgrund ungenügender Absorption quantitativ durchgeführt werden.
Hierfür wurden zwei Methoden verwendet:

1) Die Menge des heterologen Antigens, die durch 1 ml Antiserum völlig präzipitiert wird, kann aus den Immunotitrationskurven ermittelt werden. In diesem Fall muß ein leichter Überschuß an Antigen verwendet werden. Nach der Inkubation und der Zentrifugation wurde der Enzymüberschuß im Überstand durch kurze Inkubation bei p^H 2,5 - 3 inaktiviert. Der gleiche Vorgang wurde mindestens 2 mal wiederholt.

2) Antiserum wurde mit aktivierter Sepharose 4B inkubiert, die vorher mit dem heterologen Antigen verbunden wurde. Das absorbierte Antiserum wurde durch Präzipitation der Globulin-Fraktion in einer 50 %ig gesättigten Amoniumsulfat-Lösung teilweise gereinigt. Das Globulin-Präzipitat wurde in 0,1 M Borat-Saline Puffer, p^H 8, in 1/3 des ursprünglichen Antiserumvolumens gelöst. Anschließend wurde ausgiebig in demselben Puffer dialysiert, um die Sulfat-Ionen zu entfernen und hiernach abzentrifugiert.

7. Konzentrierung von Proteinlösungen:

Zur Konzentrierung verdünnter Proteinlösungen wurden folgende Methoden angewandt:
1) Geringe Proteinmengen in relativ großem Volumen (Säulen Eluate, u.s.w.) wurden in der Amicon-Ultrafiltrationszelle bei ca. 4 atü Stickstoff im 5°C Kühlraum konzentriert. Es wurden Filtermembranen des Typs PM 30, XM 50, sowie XM 100 verwendet.
2) Ultradialysehülsen der Fa. Schleicher & Schüll wurden verwendet. Die Hülsen wurden luftdicht in einen entsprechenden Dialysebehälter eingepreßt und an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen.

8. Chemikalien:

Alle verwendeten Chemikalien waren Produkte der Firma E. Merck AG, Darmstadt, falls nicht anders vermerkt. Sie hatten den Reinheitsgrad "pro analysi" oder für "biochemische Zwecke".

Trägermaterialien:
- Sephadex G-25, -50, -200; QAE-Sephadex A-50: Deutsche Pharmacia GmbH., Frankfurt.
- DEAE-Cellulose-52: Whatman & Balston, (Maidstone, Kent, England).
- Agarose: Behringwerke AG, Marburg.
- Stärke: Connaught Inc., Toronto, Kanada.

Ampholine: (LKB Ampholine-Träger Ampholyte) LKB Schweden, Uppsala
Adjuvans: Difco, Lab., Detroit, USA.
Färbe Substanzen: Coomassie-brillant blau R-250 (Serva, Heidelberg).
- 1-Naphthylphosphat di- Natriumsalz: Fluka AG., Buchs SG, Schweiz.
- Fast Blue RR Salz: (Diazotiertes 4-Benzoylamino-2,5-dimethoxyanilin $ZnCl_2$), Serva, Heidelberg.
- Alle notwendige Substanzen für PAA-Gelelektrophorese sowie die Eichproteine für Gel-Elektrophorese und Gelfiltration waren Produkte der Firmen Sigma & Boehringer.
- Neuraminidase (Cl. Rerfringens): Sigma Chem., St. Louis, USA.

9. Geräte:

- Spektralphotometer mit Thermoküvettenhalter und -schreiber (Eppendorf Gerätebau, Hamburg)
- Fraktionssammler (LKB, Stockholm, Schweden) mit Ultrarac, Typ 7000
- Uvicord Typ 4701 A
- Schreiber
- Disc-Apparatur (Shandon, London)

"Vokam" - Netzgerät
Polymerisationslampe "Photopol" mit 6W Tageslicht-Fluoreszenzröhre

- Elektrophoresekammer:

Mikrophor-Universal-Kammer (Boskamp Gerätebau, Hersel)
Netzgeräte/ (Boskamp, Pherostat)
Gamag-Geräte: (LKB Stockholm)

- Ultrafiltrationszelle (Amicon, Den Haag, Holland)

Modell 10 (Inhalt 10 ml)
Modell 402 (Inhalt 350 ml)
Ultrafiltrations-Membrane, PM 30, XM 50, XM 100, (25 mm & 76 mm Ø)

- Ultradialyse Apparatur: (Schleicher u. Schüll, Dassel)

Dialyse-Hülsen: Selectron Ultrahülsen UH100
Dialyse-Schläuche: "Visking" (Union Carbide Corp., Chicago, USA)

Zentrifugen: Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall-Inc., Norwalk, Conn.).
Kühlzentrifuge G 50K (WKF, Brandau. Odenwald).
Mixgeräte von Sorvall (Sorvall Inc. Norwalk) und Bauknecht.
Geräte für die isoelektrische Fokussierung: LKB-Produkter Bromma-Sweden.
Thermostat: Colora Messtechnik GMBH Lorch/Württ.
Hochspannungselektrophorese: Pherograph "Original Frankfurt" (Hormuth & Vetter / Heidelberg)
Geräte für die präparative Elektrophorese und Isotachophorese in PAA-Gelen: Canalco "Prep-Disc" - Holland.

Literaturverzeichnis

1) Suzuki, U. , Yoshima, Y. & Takahishi, M. (1907) J.Coll.Agr.Tokyo Imp.Univ.Bull. 7 , 503 .
2) McCollum, E. V. & Hart, E. B.(1908) J.Biol.Chem. , 4 , 497 .
3) Euler, H.& Funke,Y.(1912)Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem;77,48
4) Grosser, P. & Huster, J. (1912) Biochem.Z. , 39 , 1 . 8
5) Robison, R. (1923) Biochem.J. , 17 , 286 .
6) Robison, R. & Soames, K. M. (1923) Biochem.J. , 18 , 740 .
7) Jenner, H. D. & Kay, H. D. (1932) Brit.J.exptl.Pathol. , 13 , 22 .
8) King, E. J. & Armstrong, A. R. (1934) Canad.Med.assoc. J. , 31 , 376 .
9) Bodansky, A. (1933) J.Biol.Chem. , 101 , 93 .
10) Kay, H. D. (1932) Physiol.Rev. , 12 , 384 .
11) Bodansky, O. (1937) J.Biol.Chem. , 118 , 341 .
12) Vreven, J. , Lieberherr, M. & Vaes, G. (1973) Biochim.Biophys.Acta. , 293 , 170 .
13) Hugon, J. , Borgers, M.(1966) J.Histochem.Cytochem. 14, 629.
14) Sandborn, E. B. & Makita, T. (1969) Anat.Rec. , 63 , 255 .
15) Goldfischer, S. , Essner, E. & Norikoff, A. B. (1964) J.Histochem.Cytochem. , 12 , 72 .
16) Sandborn, E. B. & Makita, T. (1969) J.Cell.Biol. , 43 , 121 .
17) Molbert, E. , Duspiva, F. & Deimling, O. V. (1960) Histochemie , 2 , 5 .
18) Hulstaert, C. E. , Torringa, J. L. &Hardank, M. J. (1973) Gynecol.Invest. , 4 , 24 .
19) Wachstein, M. & Meisel, E. (1957)Amer.J.Clin.Pathol. 27. 13.
20) Borghese, E. (1957) Intern.Rev.Cytol. , 6 , 289 .
21) Brockman, R. , Heppel, L. (1968) Biochem. 7 , 2554 .
22) Engstrom, L. (1961) Biochim.Biophys.Acta. , 52 , 36 .
23) Torriani, A. (1960) Biochim.Biophys.Acta. , 38 , 460 .
24) Fishman, w. H. & Lin, C. W. (1973) in : Membrane Phosphohydrolases. Metabolic Conjugation and Metabolic hydrolysis, New York, Academic Press. 1973, P. 387 .
25) Schmidt, G. & Thanhauser, S. (1943) J.Biol.Chem. , 149 ,369.
26) Norman, A. W. , Mirchefe, A. K. & Adams, T. M. (1970) Biochim.Biophys.Acta. , 215 , 348 .
27) Moog, F. & Grey, R. (1968) Dev.Biol. , 18 , 481 .
28) Walker, B. A. , Eze, L. C. , Tweedie, M. & Price-Evans, D. (1971) Clin.Chim.Acta. , 35 , 433 .

29) Stolbach, L. L. , Krant, M. J. & Fishman, W. H.
(1972) Enzymologia , 42 , 431 .
30) Robison, R. & Soames, K. M. (1924) Biochem.J. , 18 , 740 .
31) Teaford, M. E. & White, A. A.
(1964) Proc.Soc.Exp.Biol.Med. , 117 , 541 .
32) Clark, L. C. & Beck, E. (1950) J.Pediat. , 36 , 335 .
33) Nagant de Deuxchaisnes, C. & Krane, S. M.
(1964) Medicine (Baltimore) , 43 , 233 .
34) Fishman, W. H. , Green, S. & Inglis, N. I.
(1962) Biochim.Biophys.Acta. , 62 , 429 .
35) Dent, C. & Harper, C. (1962) Lancet , 1 , 559 .
36) Rothbun, J. G. (1948) A.M.A.J.Diseases Children , 75 , 822
37) Fernley, H. N. & Walker, P. (1967) Biochem.J. , 104 , 1011 .
38a) Neuman, H. (1968) J.Biol.Chem. , 243 , 467 .
38b) Neuman, H. , Boross, L. & Katschalski, E.
(1967) J.Biol.Chem. , 242 , 3142 .
39) Fernley, H. N. (1971) in: Mammalian Alkaline Phosphatase ,
Chapter 18 , The Enzymes, Vol.4 , New York, Academic Press,
inc. , 1971, P. 417 .
40) Bereslow, R. & Katz, L. (1968) J.Am.Chem.Soc. , 90 , 7376 .
41) Eaton, R. H. § Moss, D. W. (1967) Nature(London) 214 , 842 .
42) Eaton, R. H. & Moss, D. W. (1968) Enzymologia , 53 , 168 .
43) Harkness, D. R. (1968) Arch.Biochem.Biophys. 126 , 503 .
44) Morton, R. K. (1955) Biochem.J. , 61 , 232 .
45) Portmann, P. (1957) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 309, 87 .
46) Garen, A. & Levinthal, C. (Biochim,Biophys.Acta.)1960.38.470
47) Heppel, L. A. , Harkness, D. R.& Hilmoe, R. J.
(1962) J.Biol.Chem. , 237 , 841 .
48) Moss, D. W. , Eaton, R. H. , Smith, J. K. & Whitby, L. C.
(1967) Biochem. J. , 102 , 53 .
49) Butterworth, P. J. (Biochem.J.) 110 , 671 , 1968 .
50) Cox, R. P. , Gilbert, P. J. & Griffin, M. J.
(1967) Biochem.J. , 105 , 155 .
51) Sussman, H. & Laga, E. (1968) Biochim.Biophys.Acta.151;281 .
52) Cathala, G. & Brunel, C. (1973) Biochim.Biophys.Acta:315;73
53) Ohkuho, A. , Langerman, N. & Kaplan, M. M.
(1974) J.Biol.Chem. , 249, 7174 .
54) Hiwada, K. & Wachsmuth, E. D. (1974) Biochem.J. , 141, 273 .
55) Fosset, M. , Chappelet-Trodo, D. & Lazdunski, M.
(1974) Biochemistry 13, 1783 .
56) Gathala, G. , Brunel, C. , Chappelet-Trodo, D. &Lazdunski,M.
(1975) J.Biol.Chem. , 250, 6040 .

57) Fernley, H. & Bisaz, S. (1968) Biochem.J. , 107, 279 .
58) Hausamen, T. , Helger, R. , Rick, W. & Gross, W. (1967) Clin.Chim.Acta. , 15, 241 .
59) Ahmed, Z. & King, E. (1960)Biochem.Biophys.Acta. 45 , 581 .
60) Ross, M. H. , Ely, J. O. & Archer, J. (1951) J.Biol.Chem. , 192, 561 .
61) Morton, R. K. (1955) Biochem.J. , 60, 573 .
62) Moss, D. W. (1969) Biochem.J. , 699 .
63) Moss, D. W. (1969) Biochem.J. , 699 .
63) Thomas,M.& Aldring,W. (1966) Biochem.J. , 98 , 94 .
64) Fernley, H. N. & Walker, P. (1970) Biochem.J., 116 , 543 .
65) Binkley, F. (1961) Biochem.Biohys.Res.Acta. , 6 , 67 .
66) Fernley, H, N. (1971) in "The Enzymes" Boyers, P.D. , ed. Vol. 4 , p. 417 . Acad. Press,New York .
67) Cathala,N. & Lazdunshi, M. (1975)J.Biol.Chem. 250 , 6046 .
68) Ghosh, N. K. & Fishman , W. H. (1968) Arch.Biochem.Biophys. , 126, 700 .
69) Lin, C. & Fishman, W. H. (1972) J.Biol.Chem. 247 , 3082 .
70) Fishman, W. & Ghosh, N. (1967)Adv.Clin.Chem. , 10, 255 .
71) Fishman, W. & Sie, G. (1971) Enzymologia 41 , 141 .
72) Fernley, H. & Walker, P. (1969) Biochem.J. , 111, 187 .
73) Lin, C. , Sie, G. & Fishman, W. (1971)Biochem.J. 124 , 509 .
74) Byers, D. A. , Fernley, H. N. & Walker, P. G. (1972) Eur.J.Biochem. , 29 , 197 .
75) Hiwada, K. & Wachsmuth, E. D. (1974) Biochem.J. , 141 ;283 .
76) Morton, R. K. (1957) Biochem.J. 65 , 674 .
77) Fishman, W. H. & Ghosh, N. K. (1967) Biochem.J. , 105;1163 .
78) Engstrom, L. (1961) Biochim.Biophys.Acta. , 54 , 179 .
79) Hinberg, I. & Laidler, K. J. (1972) (1973) Canad.J.Biochem. , 51 , 1096 .
80) Hinberg, I. & Laidler, K.J. (1972) Canad.J.Biochem. , 50 , 1334 .
81) Trentham, D. R. & Gutfreund, B. J. (1968) Biochem.J. , 106 , 455 .
82) Halford, S. E. , Bennet, N. G. & Gutfreund, B. J. (1969) Biochem.J. , 114 , 243 .
83) Lazdunski, M. , Petitclerc, C. , Chappelet, D. &Lazdunski,C. (1971) Eur.J.Biochem. , 20 , 124 .
84) Engström, L. (1961) Biochim.Biophys.Acta. , 52 , 36 .

85) Meister, A. (1950) J.Biol.Chem. , 184 , 117 .
86) Wieland, T. & Pfleiderer, G. (1957) Biochem,Z. 329 , 112 .
87) Nieland, B. (1952) J.Biol.Chem. , 199 , 373 .
88) Markert, C. L. & Möller, F.
(1959) Proc.Nat.Acad.Sci., USA. , 45 , 753 .
89) Chon, W. , Morse, D. E. & Horecker, B. L.
(1967) Proc.Natl.Acad.Sci. US. , 57 , 1013 .
90) Lai, C. Y. , Chen, C. & Horecker, B. L.
(1970) Biochem.Biophys.Res.Commun. , 40 , 461 .
91) Robinson, A. B. & Rudd, C. J. (1974) in: Current topics in cellular regulation (Horecker and Stadtman ads. NY : 8 Acad.Press .
92) Umbarger, H. E. (1961) in : Control mechanisms in cellular processes. , D.M.Bonner., Ed. 67 - 86 . The roland Press. Co. N.Y.
93) Khattab, M. J. (1973) Diplomarbeit , Ruhr-Uni. Bochum .
94) Khattab, M. J. & Pfleiderer, G.
(1976) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. , 357 , 377 .
95) Tiselius, A. , Hjerten, S. & Levin, O.
(1956) Arch.Biochem.Biophys. , 65 , 132 .
97) Mazin, A. , Sulimova, G. & Vanyushin, B.
(1974) Anal.Biochem. , 61 , 62 .
96) Skarstedt, M. & Bascomb, S. (1974) Anal.Biochem. 59 , 16 .
98)a.Cuatrecasas, P. (1972) Biochemistry 11 , 2291 .
98)b.Cuatrecasas, P. (1974) Anal.Biochem. , 60 , 149 .
99) Fishman, W. H. & Doellgast, G. (1974) Biochem.J. 141 , 103.
100) O'Carra, P. , Barry, S. & Griffin, T.
(1974) FEBS Letters 43 , 169 .
101) Wilchek, M. (1973) FEBS Letters 33 , 70 .
102) Cuatrecasas, P. (1970) J.Biol.Chem. 245 , 3059 .
103) HJerten, S. , Rosengren,J. & Pahlman, S.
(1974) J.Chromatography , 101 , 281 .
104) Davis, B. J. , (1964) Ann. N.Y.Acad.Sci. 121 , 404 .
105) Catsimpoolas, N.(1973) Sep.Sci. 8(1) , 71 .
106) Andrews, P. (1964) Biochem.J. , 91 , 222 .
& (1965) Biochem.J. , 96 , 595 .
107) Hedrick, J. L. & Smith, A. J.
(1968) Arch.Biochem.Biophys. , 126 , 155 .
108) Weber, K.& Osborn, M. (1969) J.Biol.Chem. 244 , 4406 .
109) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227 , 680 .

110) Righetti,P. & Drysdale,J. (1971)Biochim.Biophys.Acta;236;17
111) Wellner,A. (1971) Anal.Chem. 43 , 591 .
112) Francois, C. , Marshall, R. D. & Neuberger, A.
(1962) Biochem.J. , 83 , 335 .
113) Aminof, D. (1961) Biochem.J. , 81 , 384 .
114) Fiske, C.H. & Subbarow, Y.(1925)J.Biol.Chem. 66 , 375 .
115) Erdtman,H . (1928)Hoppe-Seyler's.Z.Physiol.Chem. 177;211 .
116) Albers, H. E. & Albers, H.
(1935) Hoppe-Seyler's.Z.Physiol.Chem. 232 , 165 & 189 .
117) Scmidt, G. &Thannhauser, S.(1943)J.Biol.Chem. 149 , 369 .
118) Ghosh, N. & Fishman, W.H. (1967) Fed.Proc. , 26 , 558 .
119) Sussman, H.H. & Gottlieb, A. J.
(1969) Biochim.Biophys.Acta , 194 , 170 .
120) Smith, J.K. , Eaton, R.H. , Whitby, L.C. & Moss, D.W.
(1968) Anal.Biochem. , 23 , 84 .
121) Fishman, L. , Inglis. N.R. & Fishman, W.H.
(1971) Clin.Chim.Acta , 34 , 393 .
122) Warnock, M. & Reisman, R.(1969)Clin.Chim.Acta , 24 , 5 .
123) Butterworth, P.J. (1968) , Biochem.J. , 107 , 467 .
124) Ramasamy, I. & Butterworth, P.J.
(1974) Biochim.Biophys.Acta , 370 , 477 .
125) Kratky, O. (1955) Naturwissenschaften , 244 ,
126) Gottschalk, A. & Thomas, M.A.
(1961) Biochim.Biophys.Acta , 46 , 91 .
127) Ui, N. (1973) Ann.N.Y.Acad.Sci. , 209 , 198 .
128) Susor, A. , Kochman, M. & Rutter, W.
(1973) Ann.N.Y.Acad.Sci. , 209 , 328 .
129) Drzeniek, R. (1972) in: Current topics in microbiology
and immunology. 59 , 35 .
130) Robson, E. & Harris,H. (1965) Nature, London , 207 , 1257 .
& (1967)Ann.Hum.Genet. 30 , 219 .
131) Fennelly,J., Fitzgerald,H.&McGeeney,K.(1969)Gut. , 10; 45 .
132) Moss, D.W. & Whitby, L. (1975) Clin.Chim.Acta. 61 , 63 .
133) Mestery,D. & Perry,W. (1975) Clin.Biochem. 8 , 18 .
134) Jockers-Wretow, E. , Grabert, K. & Pfleiderer, G.
(1975) Z.klin.Chem.u.klin.Biochem. 13 , 85 .
135) Wilson, A. & Kaplan, N. " Enzyme Structure and its Relation
to Taxonomy" . in;(Taxonomic Biochemistry and Serology).
C.A.Leone , ed. , Ronald Press, New York . p. 321 .

136) Arnon, R. & Neurath, H.
(1969) Proc.Nat.Acad.Sci.(USA) , 64 , 1323 .
137) Arnheim,N. , Prager, E. & Wilson, A.
(1969) J.Biol.Chem. , 244 , 2085 .
138) Murphey,T.& Mills,S.(1968) Arch.Biochem.Biophys. 127; 17 .
139) Cahn, R. , Kaplan, N. , Levine, L. & Zwilling, L.
(1962) Science , 136 , 962 .
140) Cinader,B.&Pearce,J(1956)Brit.J.Exptl.Pathol. 37 , 541 .
141) Arnheim,N. & Wilson, A.(1967)J.Biol.Chem. , 242 , 3951 .
142) Schlamowitz, M. & Bodansky, O. (1959)J.Biol.Chem. 234, 1433.
143) Sussmann, H. H. , Small, P. A. & Gottlove, E.
(1968) J.Biol.Chem. , 243 , 160 .
144) Kostner, G. & Holasek, A. (1972) Anal.Biochem. 46 , 680 .
145) Johnson, R. B. (1969) Clin.Chem. 15 , 108 .
146) Demetriow, J. A. & Beattie, J.M. (1971) Clin.Chem. 17, 290 .
147) Smith, I. , Lightstone , P. J. & Perry, J. D.
(1968) Clin.Chim.Acta. , 19 , 499 .
148) Posen, S. , Neale, F.C. & Clubb, J. C.
(1965) Ann.Intern.Med. , 62 , 1234.
149) Neale,F.C. , Clubb, J.C. , Hotchkiss, D. & Posen, S.
(1965) J.Clin.Pathol. 18 , 359 .
150) Birkett, D.J. , Conyers, R.A. & Neale, F.C.
(1967) Arch.Biochem.Biophys. 121 , 470 .
151) Epstein, E. , Wolf, P. , Horwitz, J. & Zak, B.
(1967) Am.J.Clin.Pathol. 48 , 530 .
152) Potter, M. & Hammond, J. (1973) Clin.Chim.Acta. 48 , 97 .
153) Gerhardt, W. , Lykkegaard, M.,Vang Nielsen, O. , Olsen, J.
& Statland, B. (1974) Clin.Chim.Acta. 53 , 291 .
154) Fishman, W.H. , Green, S. & Inglis, N.R.
(1963) Nature (london) 118 , 685 .
155) Fishman, W. H. & Sie, H. (1970) Clin.Chim.Acta. 29 , 339 .
156) Boyer, S. H. (1963) Ann.N.Y.Acad.Sci. 103 , 938 .
157) Korngold, L. (1970) Int.Arch.Allergy 37 , 366 .
158) Pankovich, A.M. , Sclamberg, E.L. & Stevens, J.
(1972) Int.Arch.Allergy 43 , 401 .
159) Fishman, L. , Inglis, N. & Fishman, W. H.
(1972) Clin.Chim.Acta. 38 , 75 .
160) Fishman , W. H. (1969) Ann.N.Y.Acad.Sci. 166 , 745 .
161) Butterworth, P.J. (1968) Biochem.J. 107 , 467 .
162) Benic', V. & Fišer-Herman, M.
(1970) Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem. 458 .
163) Benic', V. & Fišer-Herman, M.
(1975) Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem. 437 .

164) Gutman, A. B. (1959) Am.J.Med. 27 , 875 .
165) Pope, C. E. & Coopeband, S. R.
(1966) Gastroenterology 50 , 631 .
166) Hill, P. G. & Sammons , H.(1967) J.Clin.Pathol. 20 , 654 .
167) Price, C. P. , Hill, P. G. & Sammons, H . G.
(1972) J.Clin.Pathol. 25 , 149 .
168) Raab, W. (1968) in: Current Problems in clin.Biochem.
H. Huber , Berne 2 , 17 .
169) Haendle, H , Ingrisch, H. & Werle, E.
(1970) Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 351 , 545 .
170) Moss, D. W. (1975) Enzymes 20 , 20 .
171) Cadeau, B.J. & Malkin, A. (1973) Clin.Chim.Acta. 45 , 235 .
172) Langman, M. , Leuthold,E., Robson, E. , Harris,J. Luffman,J.
& Harris, H. (1966) Nature(london) 212 , 41 .
173) Warnock, M. L.;Proc.Soc.Exper.Biol.Med. (1968) 129 , 768 .
174) Klein, U.E. (1969) Dtsch.Med.Wsch. 94 , 526 .
175) Alpers, D. (1972) J.Clin.Invest. 51 , 2621 .
176) Bodansky, A. & Bodansky, O . (1952) in : Biochemistry of
Disease 2.Aufl. s. 348 , The MacMillan Co. , New York .
177) Dalgaard, J. B. (1949) Acta.Physiol.Scand. 16 , 293 .
178) LeVeen , H. H. , Talbot, L. J. , Restuccia, M. & Barberio,J.
(1950) J.Lab.Clin.Med. 66 , 493 .
179) Cantarow, A. & Miller,L.L. (1948)Amer.J.Physiol. 153 , 444.
180) Clubb, J. S. , Neale, F. C. & Posen, S.
(1965) J.Lab.Clin.Med. 66 , 493 .
181) Amador, E. , Dorfman, L. & Wacker, W.
(1965) Ann.Inter.Med. 62 , 30 .
182) Raab, W. (1971) Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem. 143 .
183) Pasternack, A. (1964) Scand.J.Clin.Lab.Invest. 16 , 145 .
184) Butterworth,P.J. , Moss, D.W. , Pilkanen, E. & Pringle,M.
(1965) Clin.Chim.Acta 11 , 220 .
185) Latner, A. M. , Parson,S. & Skillen, A.
(1971) Enzymologia 40 , 1 .
186) Hodson, A.& Latner, A. (1975) Clin.Chim.Acta. 61 , 53 .
187) Maruna, R.F. (1969) Clin.Chim.Acta. 25 , 133 .
188) Yong, J.M. (1967) J.Clin.Pathol. 20 , 647 .
189) Keiding , N.R. (1966) J.Clin.Lab.Invest. 18 , 134 .
190) Blomstrand, O.M.(1965) Acta.Chir.Scand. 129 , 177 .
191) Glickman, R.M. , Alpers, D. , Drummey, C. D. &Isselbacher,K.
(1970) Biochim.Biophys.Acta. 201 , 226 .

192) Beisenherz, G. , Boltz, J. , Bücher, Th. , Czok, R. , Garbade, K. , Meyer-Arendt, E. & Pfleiderer, G. (1953) Z.f.Naturforschg. , 8(b) , 555 .
193) Warburg, O. & Christian, W. (1941)Biochem.J., 310 , 384 .
194) Layne, E. (1957) in "Methods in Enzymology" 3 , 447 , (Colowick, S. & Kaplan, N.) Acad.Press., New York .
195) Lowry, O. , Rosenbrough, N. , Farr, A. & Randall, R. (1951) J.Biol.Chem. , 193 , 265 .
196) Hartree, E. F. (1972) Anal.Biochem. , 48 , 422 .
197) Pollack, R. & Schacterle, G. (1973) Anal.Biochem.51 , 654
198) Kay, H. D. (1930) J.Biol.Chem. , 89 , 235 .
199) Bessey, O. A. , Lowry, O. H. & Brock, M. J. (1946) J.Biol.Chem. , 164 , 321 .
200) Barlett, G. R. (1959) J.Biol.Chem. , 234 , 466 .
201) Ornstein, L. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci. 121 , 321 .
202) Smithies, O. (1962) Arch.Biochem.Biophys. , Suppl. , 125 .
203) Vesterberg, O. (1972) Biochim.Biophys.Acta. 257 , 11 .
204) Prusik, Z. (1968) J.Chrom. 32 , 191 .
205) Smith, E. (1968) Clin.Chim.Acta. , 19 , 499 .
206) Whitakers, J.R. (1963) Anal.Chem. 35 , 1950 .
207) Ouchterlony, O. (1949) Acta Pathol.Microbiol.Scand.26;507.
208) Grabar, P. & Williams, C. A. (1953) Biochim.Biophys.Acta , 10 , 193 .
209) Scheidegger, J. J. (1955) Int.Arch.Allergy , 7 , 105 .
210) Laurell, C. B. (1966) Anal.Biochem. , 15 , 45 .

Abkürzungen

ALP	= Alkalische Phosphatase
Anti-D-ALP(M)Serum	= Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus dem Dünndarm des Menschen.
Anti-Le-ALP(M)Serum	= Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus der Leber des Menschen.
Anti-Pl-ALP(M)Serum	= Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus der Placenta des Menschen.
Anti-Ni-ALP(M)Serum	= Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus der Niere des Menschen.
Anti-D-ALP(K)Serum	= Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus dem Dünndarm des Kalbs.
Anti-D-ALP(S)Serum	= Antiserum gegen alkalische Phosphatase aus dem Dünndarm des Schweines.
U	= Enzymeinheit.
Ag	= Antigen.
Ak	= Antikörper.
A_{280}	= Absorption bei 280 nm .
MG	= Molekulargewicht.
pI	= Isoelektrischer Punkt.
DEAE	= Diäthylaminoäthyl.
EDTA	= Äthylendiamintetraacetat.
TEMED	= N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin.
BIS	= N,N'-Methylenbisacrylamid.
TRIS (Tris)	= Tris(hydroxymethyl)-aminomethan.
Veronal	= 5,5-Diäthylbarbitursäure.
2A2MP1	= 2-amino-2-methyl-Propanol-(1).
PNPP	= p-Nitrophenylphosphat.
PÄG	= Polyäthylenglykol.
IE	= Immunoelektrophorese .
Disk	= Diskontinuierliche-(Elektrophorese).
SDS	= Natriumdodecylsulfat.
PAAG	= Polyacrylamidgel.
IEFPG	= Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen.
ITFPG	= Isotachophrese in Polyacrylamidgelen.

L e b e n s l a u f

Am 4. März 1945 wurde ich als Sohn des Landwirts Joma Khattab und seiner Ehefrau Safia Efranji in Beer-Sheba/ Palästina geboren.

1948 siedelten wir in den Gaza-Streifen um.

Von 1951 bis 1958 besuchte ich die "Primary and Preparatory School" in Nusseirat, von 1958 bis 1962 die "Secondary School" Khaled Ibn Elwaleed.

Im Jahre 1962 begann ich das Studium der Chemie und Biochemie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Ain-Shams Universität in Ägypten und im Jahre 1966 erlangte ich den Bachelor of Science(B.Sc.) Grad; anschließend arbeitete ich als Lehrer in den höheren Schulen des Gaza-Streifens.

Seit dem Sommersemester 1971 führte ich mein Studium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum fort, und legte meine Diplom-Hauptprüfung am Ende des Jahres 1973 ab.

Im Januar 1974 begann ich meine Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.G.Pfleiderer am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angeführten Literatur angefertigt habe.

Khattab, M.J.

Fotodruck: Mainz, Aachen, Malteserstraße 9, am Ponttor, Telefon (02 41) 2 73 05
Betrieb: Neupforte 13, Nähe Markt